

Marine Makro- und Mikroorganismen als Quellen für
HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Inhibitoren

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhemina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Gesa Kirsch
aus Wiesbaden

1. Referentin:	Prof. Dr. G. M. König
2. Referent:	Prof. Dr. L. Ernst
eingereicht am:	16. September 1999
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29. November 1999
	1999
	(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Matthée, G. F., Wright, A. D., König, G. M.: Three New Diterpenes from the Marine Soft Coral *Lobophytum crassum*. J. Nat. Prod. 61: 237-240 (1998).

Matthée, G., Wright, A. D., König, G. M.: HIV Reverse Transcriptase Inhibitors of Natural Origin. Planta Med. 65: 493-506 (1999).

Matthée, G., Wright, A. D., Kaminsky, R., König, G. M.: New bioactive Sesterterpenes and Antiplasmodial Alkaloids from the Marine Sponge *Hyrtios* cf. *erecta*. J. Nat. Prod.: eingereicht (1999).

Tagungsbeiträge:

Matthée, G. F., Wright, A. D., König, G. M.: Screening of Marine Organisms for HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activity. (Kurzvortrag) 44. Annual congress of the Society for Medicinal Plant Research, Prag (1996).

Matthée, G., Wright, A. D., König, G. M.: Isolierung und Charakterisierung neuer Diterpene aus der marinen Weichkoralle *Lobophytum* sp. (Poster) 9. Frühjahrstagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e. V. für den wissenschaftlichen Nachwuchs, Würzburg (1997).

Matthée, G., Höller, U., Wright, A. D., König, G. M.: Screening of Marine Organisms and Fungi for HIV-1-RT Inhibitory Activity. (Poster) 1. Euroconference on Marine Natural Products, Athen (1997).

Matthée, G., König, G. M., Wright, A. D., Kaminsky, R.: New Sesterterpenes and Antiplasmodial Alkaloids from the Sponge *Hyrtios* cf. *erecta*. (Poster) 47. Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Amsterdam (1999).

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	Biologische Prüfung von Naturstoffen zur Identifizierung neuer Leitstrukturen	5
1.2	HIV-1-Reverse-Transkriptase	6
1.2.1	Klinisch wichtige HIV-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren	6
1.2.2	HIV-Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe aus Pflanzen	8
1.2.3	HIV-Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe aus Mikroorganismen	12
1.2.4	HIV-Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe aus marinen Organismen	14
1.3	Protein-Tyrosin-Kinase p56 ^{lck}	18
1.3.1	Natürliche und synthetische p56 ^{lck} -PTK-Inhibitoren	18
1.4	Ziel der Arbeit	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Herkunft und Extraktion der im Screening untersuchten Organismen	22
2.1.1	Marine Makroorganismen	22
2.1.2	Cyanobakterien	22
2.1.3	Pilze	23
2.1.3.1	Isolierung, Kultivierung und Extraktion der Pilzstämmen	23
2.1.3.2	Künstliches Meerwasser und Kulturmedien der Pilze	23
2.1.4	Bakterien	24
2.1.5	Samenpflanzen	24
2.2	Herkunft der Reinsubstanzen	25
2.3	Herkunft und Aufarbeitung der Organismen für die Isolierung von Naturstoffen	25
2.3.1	Makroorganismen	25
2.3.2	Kultivierung, Extraktion und Aufarbeitung der Pilze	28
2.4	Biologische Tests	30
2.4.1	HIV-1-RT-Test	30
2.4.2	p56 ^{lck} -Protein-Tyrosin-Kinase-Test	30
2.4.3	Agar-Diffusions-Test	31
2.4.4	Zytotoxizität	31
2.4.5	Antivirale Aktivität auf Hepatitis-A-Virus	32
2.4.6	Hemmung von <i>Plasmodium falciparum</i>	32
2.4.7	Hemmung von <i>Trypanosoma brucei</i> ssp. <i>rhodesiense</i> und <i>T. cruzi</i>	32
2.5	Chromatographie	32
2.5.1	Dünnschichtchromatographie	32
2.5.2	Vakuum-Liquid-Chromatographie	33
2.5.3	Hochdruckflüssigchromatographie	33
2.6	Strukturaufklärung	33
2.6.1	NMR-Spektroskopie	34
2.6.2	Massenspektrometrie	34
2.6.3	UV-Spektroskopie	35
2.6.4	IR-Spektroskopie	35
2.6.5	GC-MS-Analysen	35
2.6.6	Polarimetrie	35
2.6.7	Schmelzpunkt	36
2.7	Statistische Berechnungen	36

2.8	Derivatisierungsreaktion.....	36
2.8.1	Reduktion von Dictyodial	36
2.9	Chemikalien	37
2.10	Beteiligte Personen und Institute.....	37
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Screening von Extrakten und Reinsubstanzen	40
3.1.1	Untersuchung von Extrakten.....	42
3.1.2	Untersuchung von Reinsubstanzen	46
3.1.2.1	Reinsubstanzen mit HIV-1-RT-Hemmaktivität	48
3.1.2.2	Reinsubstanzen mit p56 ^{lck} -PTK-Hemmaktivität	48
3.2	Charakterisierung der untersuchten Organismen	51
3.2.1	<i>Hyrtios cf. erecta</i>	53
3.2.1.1	Biologische Aktivitäten von <i>Hyrtios cf. erecta</i>	59
3.2.2	<i>Xestospongia rosariensis</i>	64
3.2.2.1	Biologische Aktivitäten von <i>Xestospongia rosariensis</i>	65
3.2.3	<i>Amphimedon</i> sp.	68
3.2.3.1	Biologische Aktivitäten von <i>Amphimedon</i> sp.	69
3.2.4	<i>Dictyota volubilis</i>	70
3.2.4.1	Biologische Aktivitäten von <i>Dictyota volubilis</i>	71
3.2.5	<i>Ulocladium botrytis</i> und <i>Epicoccum</i> sp.	74
3.2.5.1	Biologische Aktivitäten von <i>Ulocladium botrytis</i> und <i>Epicoccum</i> sp.	75
3.2.5.2	Biotest geführte Fraktionierung der Extrakte von <i>Ulocladium botrytis</i> und <i>Epicoccum</i> sp.	75
3.2.6	<i>Lobophytum crassum</i>	78
3.2.6.1	Biologische Aktivitäten von <i>Lobophytum crassum</i>	83
4	DISKUSSION	86
4.1	Biologische Prüfung von Extrakten und Reinsubstanzen.....	86
4.2	Charakterisierung der untersuchten Organismen	92
4.2.1	Chemie und Taxonomie	92
4.2.2	Biologische Evaluierung der isolierten Reinsubstanzen.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	98
6	ANHANG	99
6.1	Teil 1: Herkunft der Organismen und biologische Aktivitäten der Extrakte.....	99
6.1.1	Marine Makroorganismen	100
6.1.2	Cyanobakterien	101
6.1.3	Pilze	101
6.1.3.1	Zur Isolierung von Pilzstämmen verwendete Makroorganismen	101
6.1.3.2	Untersuchte Pilzisolat	102
6.1.4	Samenpflanzen	102
6.2	Teil 2: ¹ H-NMR-Spektren von Reinsubstanzen.....	104
6.3	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	115
6.3.1	Tabellen	115
6.3.2	Abbildungen	116
7	LITERATUR.....	117

Abkürzungen

1D	<u>1-Dimensional</u>
2D	<u>2-Dimensional</u>
AG	<u>A</u> rbeits <u>G</u> ruppe
AIDS	<u>A</u> cquired <u>I</u> mmuno- <u>D</u> eficiency <u>S</u> yndrome
AMV	<u>A</u> vian <u>M</u> yeloblastosis <u>V</u> irus
ASW	<u>A</u> rtificial <u>S</u> ea <u>W</u> ater
AZT	3'- <u>A</u> zido-3'-Deoxy <u>T</u> hymidin
BB	¹ H- <u>B</u> reit <u>B</u> andentkopplung
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CI	<u>C</u> hemische <u>I</u> onisation
COSY	<u>C</u> Orrrelated <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>
δ	chemische Verschiebung, angegeben in ppm
DC	<u>D</u> ünnschicht <u>C</u> hromatographie
DDDP	<u>D</u> N <u>A</u> <u>D</u> irected <u>D</u> N <u>A</u> <u>P</u> olymerase
DEPT	<u>D</u> istortionless <u>E</u> nhancement by <u>P</u> olarisation <u>T</u> ransfer
DMSO	<u>D</u> i <u>M</u> ethyl <u>S</u> ulf <u>O</u> xid
DTT	<u>D</u> i <u>T</u> hio <u>T</u> hreitol
EDTA	<u>E</u> thylen <u>D</u> iamin <u>T</u> etra <u>A</u> cetate
EGTA	<u>E</u> thylen <u>G</u> lycol-bis(β-aminoethylether)- <u>T</u> etra <u>A</u> cetate
EGF	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
EI	<u>E</u> lektronenstoß <u>I</u> onisation
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno- <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
EtOAc	<u>E</u> thyl <u>A</u> cetate
EtOH	<u>E</u> thanol
FAB	<u>F</u> ast- <u>A</u> tom <u>B</u> ombardment
FRhK	<u>F</u> etal <u>R</u> hesus <u>M</u> onkey <u>K</u> idney
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>E</u> thyl)-1- <u>P</u> iperazin <u>E</u> than <u>S</u> ulfonsäure
HAV	<u>H</u> epatitis- <u>A</u> - <u>V</u> irus
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmuno-deficiency <u>V</u> irus/ <u>V</u> iren
HMBC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation
HMQC	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>Q</u> uantum <u>C</u> orrelation
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
IC ₅₀	<u>50</u> % <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration
IR	<u>I</u> nfra <u>R</u> ot
Lck	Gen, kodiert die <u>L</u> ympho <u>C</u> yten Tyrosin- <u>K</u> inase p56 ^{lck}

MALDI/TOF	<u>M</u> atrix <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption <u>I</u> onisation/ <u>T</u> ime <u>O</u> f <u>F</u> light
MCV	<u>M</u> urine <u>C</u> ytomegalo <u>V</u> irus
MeOH	<u>M</u> ethanol
MIC	<u>M</u> inimum <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration
MLV	<u>M</u> urine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus
MMuLV	<u>M</u> oloney <u>M</u> urine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus
MS	<u>M</u> assen <u>S</u> pektrometrie, bzw. <u>M</u> assen <u>S</u> pektrometrisch
NMR	<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance
NNRTI	<u>N</u> icht- <u>N</u> ukleosidische <u>RT</u> - <u>I</u> nhibitoren
NOE	<u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> ffect
NOESY	<u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser and <u>E</u> xchange <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>
NRTI	<u>N</u> ukleosidische <u>RT</u> - <u>I</u> nhibitoren
NT	<u>N</u> icht- <u>T</u> ransmembrane
p56 ^{lck}	Gen <u>P</u> rodukt von <u>L</u> ck, M _r <u>56</u> kD, eine Protein-Tyrosin-Kinase
PTK	<u>P</u> rotein- <u>T</u> yrosin- <u>K</u> inase(n)
PTKI	<u>P</u> rotein- <u>T</u> yrosin- <u>K</u> inase- <u>I</u> nhibitor
RDDP	<u>R</u> NA <u>D</u> irected <u>D</u> NA <u>P</u> olymerase
RLV	<u>R</u> auscher murine <u>L</u> eukemia <u>V</u> irus
RNase H	<u>R</u> ibo <u>N</u> uclease <u>H</u>
ROESY	<u>R</u> otating frame nuclear <u>O</u> verhauser and <u>E</u> xchange <u>S</u> pectroscopy
RP	<u>R</u> eversed <u>P</u> hase
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase
RTI	<u>R</u> everse- <u>T</u> ranskriptase- <u>I</u> nhibitor(en)
SC	<u>S</u> äulen <u>C</u> hromatographie
Smp.	<u>S</u> ch <u>M</u> elz <u>P</u> unkt
Src	Rous <u>SaR</u> Coma Virus Onkoprotein, zellulären oder viralen Ursprungs, namensgebend für eine PTK-Familie
TH	<u>T</u> otal <u>H</u> emmung
UV	<u>U</u> ltra <u>V</u> iolett
VLC	<u>V</u> akuum- <u>L</u> iquid- <u>C</u> hromatographie
WH	<u>W</u> achstums <u>H</u> emmung

1 Einleitung

1.1 Biologische Prüfung von Naturstoffen zur Identifizierung neuer Leitstrukturen

Bei der Suche nach neuen Arzneistoffen stehen schwer oder gar nicht therapierbare Erkrankungen des Menschen, wie Krebs oder AIDS, im Mittelpunkt. Zur Entdeckung neuer Pharmaka werden verschiedene Ansätze verfolgt:¹ zum einen der computerunterstützte Entwurf von neuen Medikamenten (Computer-aided Drug Design), zum anderen die kombinatorische Chemie.^{2,3,4}

Ein dritter Weg ist die Untersuchung von Extrakten natürlicher Quellen auf ihre biologischen Aktivitäten. Daran schließt sich die Isolierung und Charakterisierung der aktiven Naturstoffe an.⁵ Durch eine erste Untersuchung, auch als Primär-Screening bezeichnet, wird das Vorhandensein von biologisch aktiven Substanzen in Extrakten festgestellt. Hierbei können beispielsweise isolierte Zielstrukturen, wie Enzyme und Rezeptormoleküle, oder Zellsystems eingesetzt werden. In einem anschließenden sekundären Screening müssen die potentiellen Wirkstoffe genauer charakterisiert werden.^{6,7,8} Dabei wird z. B. die Selektivität oder die Wirkung im Tierexperiment geprüft, um die Aussichten der weiteren Entwicklung einer Verbindung zu beurteilen. Wurden früher vor allem terrestrische Pflanzen als Ausgangsmaterial verwendet, so konzentrieren sich die Untersuchungen heute auf Makro- und Mikroorganismen aus weniger leicht zugänglichen Lebensräumen.⁹ Die Zielstrukturen für die biologische Prüfung (Screening) der Extrakte müssen eine praktische Bedeutung für die Therapie der Erkrankung besitzen. Daneben ist die sorgfältige Auswahl der in das Screening einzubringenden Substanzen und Organismen ebenso wichtig.

Um möglichst schnell die gewünschten Aktivitäten zu identifizieren, werden oft Aktivitätsprüfungen und Isolierungsarbeiten im selben Labor durchgeführt. Die Assays müssen einfach zu handhaben sein und gut reproduzierbare Ergebnisse liefern. Dabei werden u. a. isolierte Enzyme als sehr spezifische Zielstrukturen eingesetzt, was zum Auffinden selektiver Inhibitoren führen kann. Jedoch wird so die Verfügbarkeit und Wirksamkeit von Substanzen in einem lebenden Organismus nicht berücksichtigt. Um Aussagen über die biochemischen Charakteristika hinaus machen zu können, müssen sich daher weitere Untersuchungen der identifizierten Verbindungen anschließen, in denen vor allem die Wirkungen auf Zellen, Organe und Tiere untersucht werden.

Organismen mariner Herkunft sind im Vergleich mit auf dem Land vorkommenden Arten weniger intensiv erforscht und besitzen ein großes Potential als Lieferanten neuartiger Substanzen mit biologischer Wirkung.^{10,11} In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb vor allem Extrakte mariner Makro- und Mikroorganismen untersucht. Als Zielstrukturen wurden die Enzyme HIV-1-RT und die PTK p56^{lck} eingesetzt. HIV-1-RT-Hemmstoffe sind von Bedeutung bei der Therapie von AIDS, Inhibitoren der PTK p56^{lck} können möglicherweise bei bestimmten Erkrankungen der T-Lymphozyten eingesetzt werden.

1.2 HIV-1-Reverse-Transkriptase

Human Immuno-deficiency Virus (HIV), das die Immunschwäche AIDS verursachende Retrovirus, wurde intensiv untersucht. Verschiedene spezifische Prozesse des viralen Lebenszyklus konnten als Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie der Erkrankung identifiziert werden.¹² Ein kritischer Schritt für die Replikation des Virus ist die reverse Transkription des genetischen Materials, die durch das Enzym HIV-RT katalysiert wird. AIDS wird mit einer Tripelkombination aus HIV-1-RT- und HIV-Protease-Hemmstoffen behandelt, womit zwei wichtige Schritte im viralen Zyklus gehemmt werden.^{13,14} Die für HIV typische hohe Mutationsrate resultiert oft in einer schnellen Resistenzentwicklung des Erregers gegen die eingesetzten Arzneistoffe.¹⁵ Daher besteht ein fortwährender Bedarf an alternativen Hemmstoffen der kritischen HIV-Enzyme, HIV-1-RT eingeschlossen. Neu entdeckte RT-Hemmer mit neuartigen strukturellen Eigenschaften und Wirkmechanismen sollten die Entwicklung von Resistenzen verzögern helfen und damit schließlich zur Kontrolle von HIV-Infektionen beitragen können.

Übersichtsarbeiten zur anti-HIV Aktivität von Naturstoffen im allgemein wurden bereits von Vlietinck *et al.*,¹⁶ Ng *et al.*,¹⁷ und Kinghorn¹⁸ verfasst. Basierend auf einem Übersichtsartikel, der im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde, wird im weiteren die RT-Hemmung durch Substanzen aus terrestrischen und marinen Makro- und Mikroorganismen zusammenfassend dargestellt.¹⁹ Es werden auch klinisch bedeutsame Wirkstoffe vorgestellt. Der Schwerpunkt liegt auf Naturstoffen, die wichtige Neuerungen darstellen.

1.2.1 Klinisch wichtige HIV-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Nukleosidische RT-Hemmstoffe waren die ersten anti-HIV-Agentien, die eine breite Anwendung in der Klinik erfuhren. Ihre Wirksamkeit ist gut dokumentiert, und trotz Resistenzentwicklung sind sie wichtige Wirkstoffe gegen AIDS geblieben.¹⁴ Erste Untersuchungen

über die antivirale Wirksamkeit von Nukleosiden in den 60er Jahren²⁰ gehen zurück auf die Isolierung von Arabinofuranosylthymidin und Arabinofuranosyluracil aus *Cryptotethia crypta*, einem Schwamm aus der Karibik.²¹ 1998 waren fünf NRTIs als Arzneimittel zugelassen, Lamivudin (Epivir[®]), Zalcitabin (HIVID[®]), Zidovudin oder AZT (Retrovir[®]), Didanosin (Videx[®]), und Stavudin (Zerit[®]). NRTI sind Prodrugs, die von Kinasen triphosphoryliert werden, dann zur kompetitiven Hemmung von RT und zum Kettenabbruch bei der DNA-Synthese führen.²²

Der erste nicht-nukleosidische HIV-1-RT-Hemmstoff, Nevirapin, gehört zu einer Reihe von Substanzen, die ursprünglich als Muskarinrezeptorantagonisten synthetisiert wurden.²³ Nevirapin (Viramune[®]) und weitere NNRTIs, wie z. B. Delavirdin (Rescriptor[®]), werden mittlerweile in der Kombinationstherapie eingesetzt. Ein weiterer vielversprechender NNRTI ist der Naturstoff Calanolide A, ein Cumarin isoliert aus *Calophyllum lanigerum* (Guttiferae), welches seit 1998 in einer klinischen Studie (Phase I) untersucht wurde.^{24,25}

Kinetische Studien haben ergeben, dass die bisher zugelassenen NNRTIs eine nicht kompetitive Hemmung von HIV-RT bewirken.²⁶ Durch röntgenkristallographische Untersuchungen des HIV-1-RT-Nevirapin-Komplexes konnte gezeigt werden, dass der Arzneistoff an einer anderen Stelle bindet als der Template-Primer-Komplex und die Nukleotide. Das lässt die nicht-kompetitive Wechselwirkungen und sterische Faktoren als Wirkungsmechanismus der NNRTI vermuten.²⁷

Strukturell sehr unterschiedliche Substanzen mit einem neuen Mechanismus der RT-Hemmung wurden beschrieben, darunter Oligonukleotide, Ribozyme, RNase-H- und Dimerisations-Inhibitoren, die möglicherweise zu weiteren neuartigen RTI entwickelt werden können.²⁸

1.2.2 HIV-Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe aus Pflanzen

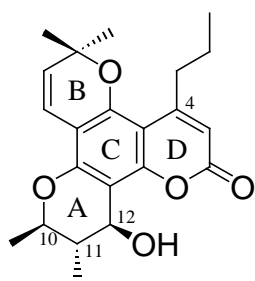
Terrestrische Pflanzen sind traditionell Quellen zur Isolierung biologisch aktiver Naturstoffe. Auch Substanzen, die HIV oder die isolierte HIV-1-RT zu hemmen vermögen, stammen zum großen Teil aus dieser Gruppe von Organismen, die im allgemeinen noch leicht zugänglich ist. Die RTI aus Pflanzen, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind, werden im folgenden Text ausführlich beschrieben.

Tabelle 1: Aktivitäten der RTI aus Pflanzen

Substanz	Quelle	IC ₅₀ -Wert (HIV-1-RT) [μM]	Ref.
Calanolide A	<i>Calophyllum lanigerum</i>	0,07	24
Michellamine B	<i>Ancistrocladus korupensis</i>	121,7	37
Hypericin	<i>Hypericum perforatum</i>	0,77	39
1,2,5,8-Tetrahydroxy-anthrachinon	*	3,1	39
Baicalein	*	8 (70% Hemmung)	45
Fagaronin	*	26	57
Nitidin	*	128	58
Buchapin	<i>Euodia roxburghiana</i>	12	59
Euodia-Chinolin	<i>Euodia roxburghiana</i>	8	59
Gomisin J	<i>Schisandra chinensis</i>	116	62
Verbindung 1506	*	2	62
Verbindung 1737	*	3,6	63
Verbindung 1738	*	1,7	63

* Herkunftsorganismus nicht beschrieben oder synthetisierte Derivate

Am US National Cancer Institute (NCI) wurde eines der größten anti-HIV-Screening-Programme mit Naturstoffen durchgeführt. Hierbei wurde auch (+)-Calanolide A aus den



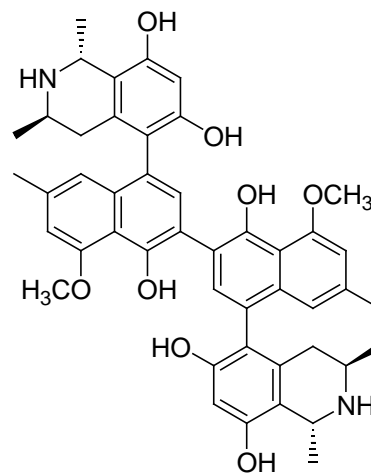
(+)-Calanolide A

Früchten und Zweigen von *Calophyllum lanigerum* isoliert.²⁴ Calanolide A schützte bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen humane T-Lymphozyten vollständig vor den pathogenen Effekten des HIV-1. Die Substanz wirkte als NNRTI und zeichnete sich durch potente und selektive Hemmung von HIV-1-RT gegenüber HIV-2-RT aus. Die Aktivität der Substanz gegen Stämme von HIV, die resistent gegen AZT und Pyridone (G-9106, A 17) waren, zeigte ebenfalls die Unterschiede zu den herkömmlichen NNRTIs auf. Diese Eigenschaften von Calanolide A führten zur Auswahl dieser Substanz für weitergehende

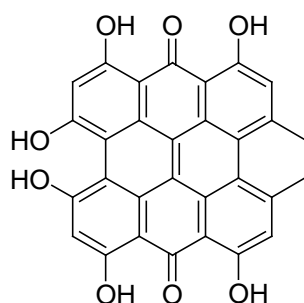
Untersuchungen und möglicherweise zur Entwicklung einer neuen Klasse von NNRTIs. Ähnliche Coumarine mit Wirkung gegen HIV wurden in vielen Nachfolgearbeiten beschrieben.^{29,30,31,32,33} Zur Gewinnung von zur Arzneistoffentwicklung ausreichenden Substanzmen-

gen wurde die Totalsynthese für racemisches und (+)-Calanolide A beschrieben.^{34,35} Obwohl der Naturstoff (+)-Calanolide A verglichen mit dem Razemat die größere Aktivität besaß, wurde in einer klinischen Studie (Phase I) die racemische Mischung von Calanolide A eingesetzt.^{25,36}

Aus *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae), einer im tropischen Regenwald Kameruns vorkommenden Pflanze, wurden die drei Naphthylisochinolinalkaloid-Dimere Michellamin A-C isoliert, die humane T-Lymphozyten vor der Infektion mit HIV-1 und HIV-2 schützen konnten. Das potenteste der drei Atropisomere, Michellamine B, befindet sich zur Zeit in der präklinischen Entwicklung.³⁷ Der wahrscheinlich neuartige Wirkungsmechanismus der Verbindung beruht auf einer Hemmung der Virus-Zell-Fusion und der Syncytium-Bildung. Auch HIV-1-RT und HIV-2-RT wurden, allerdings nur mäßig, gehemmt. Insgesamt stellen Michellamine also eine neue Klasse von anti-HIV-wirksamen Naturstoffen dar. Sie sind potentielle Leitstrukturen und damit Ausgangspunkt für synthetische Derivate mit verbesserter Wirksamkeit.³⁸



Michellamin B



Hypericin

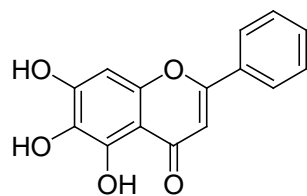
Die Wirkungen synthetischer und natürlich vorkommender Naphtho- und Anthrachinone wurden gegenüber kultivierten HIV und auch isolierten RTs untersucht.^{39,40} Zwei dieser Verbindungen, Hypericin und 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon, wurden genauer analysiert. Die viruziden Effekte von Hypericin beruhten jedoch nicht auf einer Hemmung der HIV-RT sondern der Virusfreisetzung.^{41,42} Wegen seiner starken Zytotoxizität wurde die antivirale Wirkung von 1,2,5,8-Tetrahydroxyanthrachinon nicht weiterverfolgt.³⁹

Andere Sekundärstoffe aus höheren Pflanzen, die auf ihre RT-Hemmaktivität umfassend untersucht wurden, sind Tannine, Flavonoide und Alkaloide.^{43,44,45,46,47,48} In der Annahme, dass die Polymerase- oder Substrat-Bindungsstellen in RTs aus verschiedenen Retroviren ähnlich sind, wurden in vielen Studien auch andere RTs als die des HIV eingesetzt, wie z. B. von Ono *et al.*⁴⁹

Einige Tannine zeigten *in vitro* signifikante HIV-RT-Hemmung, ihre antivirale Aktivität in intakten Zellsystemen kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Beeinflussung der Virus-Zell-Adhäsion zurückgeführt werden.⁵⁰ Auch konnte BSA die HIV-RT-Hemmung

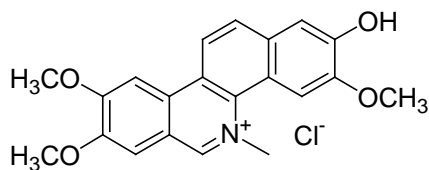
von Tanninen aufheben, d. h. die beobachtete RT-Hemmung war unspezifisch.⁵¹ Zusätzlich schränkte die Zytotoxizität der Tannine deren Eignung als Arzneistoffe stark ein.⁵² Insgesamt haben diese Untersuchungen zu dem Schluss geführt, dass gewöhnliche Tannine bei der Suche nach neuen RTI ausgeschlossen werden können.

Die antivirale Wirkung von Flavonoiden konnte in verschiedenen Virus-Zell-Kulturen und auch im Tiermodell gezeigt werden.⁵³ Zwar resultierten aus Screeninguntersuchungen einige in vitro aktive RTI,⁴⁶ jedoch zeigte nur Baicalein eine selektive RT-Hemmung. Wie andere Flavonoide wies Baicalein in einem Zellkulturassay mit HIV-1 und MT-4 Zellen allerdings Zytotoxizität bei Konzentrationen auf, die bei HIV-1-RT noch nicht zu signifikanter Hemmung führten.⁴⁵ Die Fülle der Daten, die über RT-Hemmung von Flavonoiden vorliegen, führte zur Diskussion von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, deren Relevanz jedoch bezweifelt werden muss.⁴⁵ Es konnte auch hier geschlossen werden, dass gewöhnliche Flavonoide, die zwar in vitro als RTI wirken, für die Entwicklung von neuen Leitstrukturen nicht von Interesse sind.

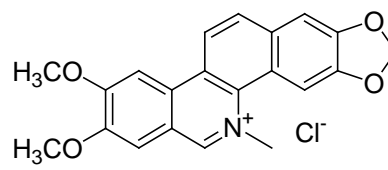


Baicalein

Alkaloide wurden sowohl mittels AMV-, RLV- und Simian Sarcoma Virus-RT,^{54,55,56} als auch gegenüber RT aus HIV untersucht.^{57,58}

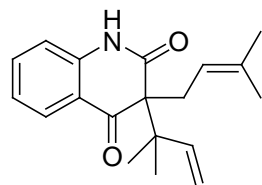


Fagaroninchlorid

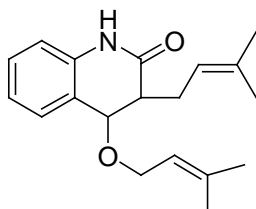


Nitidinchlorid

Vor allem die Benzophenanthridinalkaloide Fagaronin und Nitidin wurden als starke Hemmstoffe erkannt. Aus den am NCI im Screening aufgefallenen Extrakten der Blüten, Blätter und



Buchapin

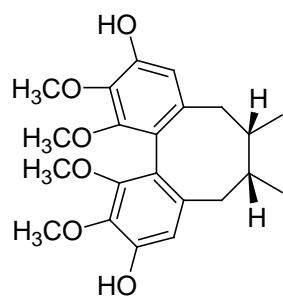


Euodia-Chinolin

Zweige von *Euodia roxburghiana* (Rutaceae), einem in Australien und Teilen von Asien volksmedizinisch genutzten Baum, wurden Buchapin und ein weiteres als *Euodia*-Chinolin bezeichnetes Alkaloid isoliert.⁵⁹ Beide im anti-HIV-Zellkulturtest wirksame Verbindungen erwiesen sich als po-

tente HIV-1-RT-Hemmstoffe.⁵⁹

Lignane sind eine weitere Naturstoffgruppe mit antiviraler Aktivität, die z. B. schon 1989 an MCV in Zellkulturtests untersucht wurde,⁶⁰ und deren Bedeutung und Wirkmechanismen 1998 in einer Übersicht dargestellt wurden.⁶¹ Als Hemmstoff der RT wurde (-)-

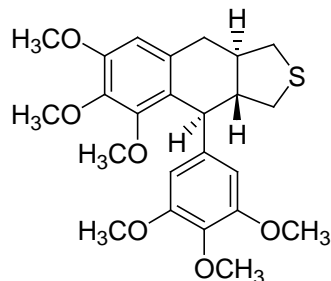


Gomisin J

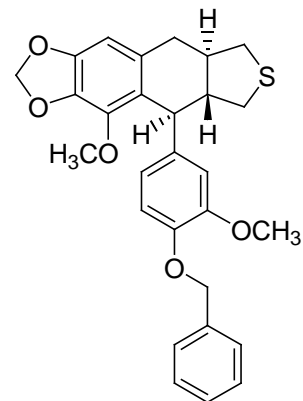
Gomisin J, ein Dibenzocyclooctadien-Lignan, aus den Früchten von *Schisandra chinensis* (Schisandraceae) identifiziert. Bei Versuchen die Aktivität von Gomisin J durch Strukturvariation zu verbessern, konnte das dibromierte Derivat (Verbindung 1506) mit stärkerer und auch selektiverer Wirkung gefunden werden.⁶² Aus

Extrakten einer weiteren *Schisandra* sp. isolierte HIV-1-RT-Hemmstoffe gehörten zur Gruppe der Tetrahydronaphthalen-Lignane. Um die Zytotoxizität zu verringern, wurde eine Reihe von Derivaten synthetisiert und die antivirale Wirkung genauer

untersucht. Die Verbindungen 1737 und 1738 zeigten die potentesten Aktivitäten im HIV-1-RT-Test und waren in Zellkulturtests mit HIV-1 und MT-4 Zellen selektiv wirksam.⁶³



Verbindung 1737



Verbindung 1738

1.2.3 HIV-Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe aus Mikroorganismen

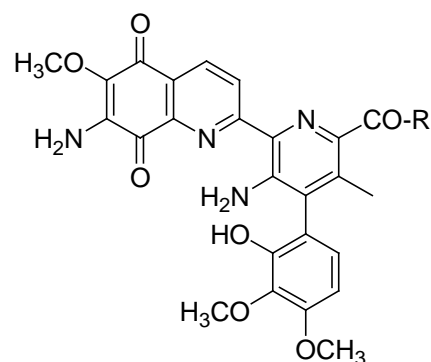
Die Untersuchung von Bakterienextrakten und einer Reihe von Antibiotika führte zur Identifizierung von RTI. Die im folgenden Text genannten und aus Mikroorganismen erhaltenen Substanzen werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Aktivitäten der RTI aus Mikroorganismen

Substanz	Quelle	IC ₅₀ -Wert (HIV-RT) [μM]	Ref.
<i>Quinoxapeptin A</i>	Actinomycet (nicht bestimmt)	4 nM (40 nM, HIV-2-RT)	64
<i>Luzopeptin A</i>	<i>Actinomadura luzonensis</i>	7 nM (68 nM, HIV-2-RT)	65
<i>Streptonigrin-Ester</i>	*	91-100 (70% Hemmung)	66
<i>Streptonigrin-Säure</i>	*	99 (87% Hemmung)	66
<i>Novenamine</i>	*	25 bis 75	67
<i>Ambigol A</i>	<i>Fischerella ambigua</i>	54 mM	69
<i>Podoscyphic Acid</i>	<i>Podoscypha</i> sp.	355 (34% Hemmung)	72
<i>Clavicornic Acid</i>	<i>Clavicornia pyxidata</i>	404 (30% Hemmung)	72
<i>Mniopetal F</i>	<i>Mniopetalum</i> sp.	30	75
<i>Asterriquinone</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	9	77

* Herkunftsorganismus nicht beschrieben oder synthetisierte Derivate

Aus einem nocardiformen Actinomycet wurden die beiden Chromodepsipeptide Quinoxapeptin A und B isoliert. Quinoxapeptin A wies die stärkere Aktivität auf und wirkte selektiv, die Aktivität anderer humaner DNA Polymerasen wurde bei den wirksamen Konzentrationen nicht beeinflusst.⁶⁴ Das strukturell sehr ähnliche Luzopeptin A, das aus dem Actinomycet *Actinomadura luzonensis* stammt,⁶⁵ wurde ebenfalls in der oben genannten Studie als HIV-RTI beschrieben. Weitere Antibiotika, wie verschiedene Makrolide, Polyether, Bleomycine und Tetracykline, wurden auf ihre polymerase-hemmenden Eigenschaften gegen HIV-RT, AMV-RT und DNA-Polymerasen untersucht. Die hierbei aufgefallenen Streptonigrin-Ester hemmten die HIV-1-RT selektiv, jedoch nur mittelmäßig potent, die Streptonigrin-Säure dagegen hemmte neben HIV-1-RT auch AMV-RT.⁶⁶ Synthetische Derivate von Novobiocin, einem Antibiotikum aus *Streptomyces niveus*, sind die Novenamine,

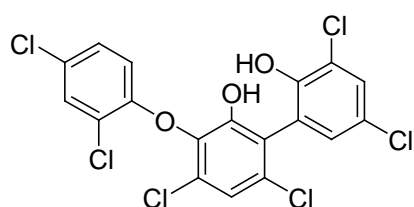


Streptonigrin-Derivate

R = -OCH₃, -O(CH₂)₂CH₃,
-OCH(CH₃)₂, -O(CH₂)₃CH₃,
-OH

welche den Zucker Noviose und verschieden substituierte Cumarin-Reste enthalten. Alle Novenamine hemmen erst bei höheren Konzentrationen die RNase-H-Funktion von HIV-RT selektiv.⁶⁷

In einem groß angelegten Screening von Cyanobakterien (Blaualgen) wurden Extrakte von mehr als 900 kultivierten Stämmen untersucht. Extrakte von einigen Stämmen, wie z. B. von *Nostoc* sp., *Phormidium* sp. und *Oscillatoria* sp., hemmten auch HIV-1-RT.⁶⁸



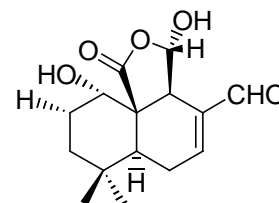
Ambigol A

Eine weitere Studie über Cyanobakterien führte zur Isolierung von Ambigol A, einem Metaboliten aus *Fischerella ambigua*, der mit mäßiger Aktivität HIV-1-RT hemmte.⁶⁹

⁷⁰ Der antivirale Effekt von Sulfoglykolipiden aus Cyanobakterien wurde zuerst im anti-HIV Screening des NCI entdeckt.⁷¹ 1989 wurden solche Sulfoglykolipide daher für eine Präklinischen Studie ausgewählt. Über die weitere Entwicklung der Substanzen wurde nichts berichtet, so

dass die antivirale Wirksamkeit von Sulfoglykolipiden als bedeutungslos angesehen werden kann.

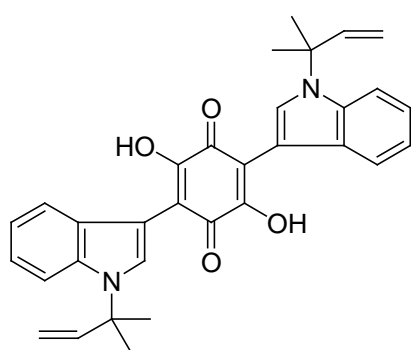
Die Suche nach RTI bei 545 kultivierten Basidiomyceten führte zur Identifizierung strukturell unterschiedlicher Pilzmetabolite, die HIV-1-RT unterschiedlich stark hemmen konnten.⁷² Podoscyphic Acid aus *Podoscypha* sp. und Clavicornic Acid aus *Clavicornia pyxidata* waren nur schwache und nicht selektive RTI.^{73,74} Aus einer *Mniopetalum* sp. wurden weitere gegen HIV-RT aktive Metabolite, die Mniopetale isoliert, die alle schwach



Mniopetal F

antimikrobiell und zytotoxisch wirksam waren. Mniopetal F, der Metabolit mit der stärksten

Hemmung von HIV-1-RT, war bei den entsprechenden Konzentrationen stark zytotoxisch.⁷⁵ Bei der Untersuchung von Pigmenten aus *Aspergillus terreus* wurde Asterriquinone identifiziert, und mehrere Analoga hiervon wurden hergestellt.⁷⁶ Auch die Aktivität gegenüber HIV-1-RT wurde evaluiert, und einige der Substanzen wurden als HIV-1-RT-Inhibitoren erkannt, wobei die Ausgangs-



Asterriquinone

verbindung zwar die selektivste, jedoch die am wenigsten aktive Verbindung dieser Reihe war.⁷⁷

1.2.4 HIV-Reverse-Transkriptase-Hemmstoffe aus marinen Organismen

Bei marinen Makroorganismen aus dem Tierreich konzentrierte sich die Suche nach RTI hauptsächlich auf Schwämme. Die Mehrzahl der in Tabelle 3 zusammengestellten Substanzen aus Meeresorganismen stammt aus dieser Organismengruppe, nur Kelletin A aus einer Molluske, und Peyssonol A, Dictyodial und Hydroxydictyodial aus Algen.

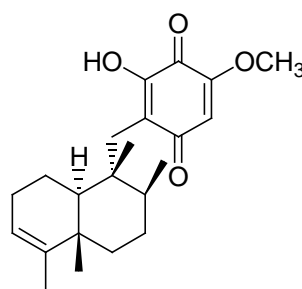
Tabelle 3: Aktivitäten der RTI aus Marinen Organismen

Substanz	Quelle	IC ₅₀ -Wert (HIV-1-RT) [μM]	Ref.
Avarone E	<i>Dysidea cinerea</i>	2,8 ^a / 140 ^b (90% Hemmung)	78
Avarol F	<i>Dysidea cinerea</i>	21 ^a / 147 ^b (90% Hemmung)	78
Illimaquinone	<i>Smenospongia</i> sp.	15 ^b	80
Hyatellaquinone	<i>Hyatella intestinalis</i>	-	81
Toxiusol	<i>Toxiclona toxius</i>	1,5 ^a	82
Taurospongine	<i>Hippospongia</i> sp.	6,5	83
Petrosynol	<i>Petrosia</i> sp.	15,8 ^a / 36,0 ^c	84
Petrosolic Acid	<i>Petrosia</i> sp.	1,2 ^a / 6,2 ^c	84
3,5,8-Trihydroxy-4-quinolone	<i>Verongia</i> sp.	3 ^a / 43 ^c	85
Isodehydroloffariellolide	<i>Fascaplysinopsis reticulata</i>	2,6 mM (81% Hemmung)	86
Fascaplysin	<i>Fascaplysinopsis reticulata</i>	3,7 mM (58% Hemmung)	86
Homafascaplysin A Kation/Dehydro- loffariellolide Dianion	<i>Fascaplysinopsis reticulata</i>	1,4 mM (94% Hemmung)	86
Plakanidine A	<i>Plakortis</i> sp.	-	87
Halocynthiaxanthin	Schwamm (nicht bestimmt)	7 ^a / 28 ^c	88
Kelletin A	<i>Buccinum corneum</i>	12 (46% Hemmung)	91
Peyssonol A	<i>Peyssonellia</i> sp.	-	81
Hydroxydictyodial	<i>Dictyota dichotoma</i> /D. patens	13,5	98
Dictyodial	<i>Dictyota dichotoma</i> /D. patens	30	98

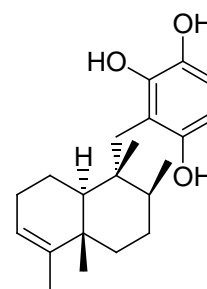
^a RDDP; ^b RNase H; ^c DDDP

Eine Reihe von sesquiterpenoiden Hydrochinonen und Chinonen wurde als RTI identifiziert. Avarone E und Avarol F aus *Dysidea cinerea* (Dysideidae) waren die wirksamsten der untersuchten Verbindungen.⁷⁸ Weitere strukturell verwandte Substanzen wurden in *D. cinerea*⁷⁹ und in einer *Smenospongia* sp. (Irciniidae)⁸⁰ gefunden. Illimaquinone aus der *Smenospongia* sp.

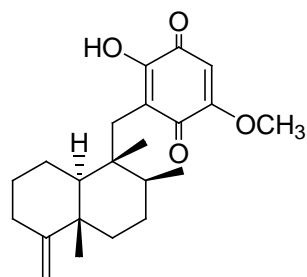
hemmte die RNase-H-Aktivität von HIV-1-RT stark und sehr selektiv, d. h. die Aktivität von



Avarone E



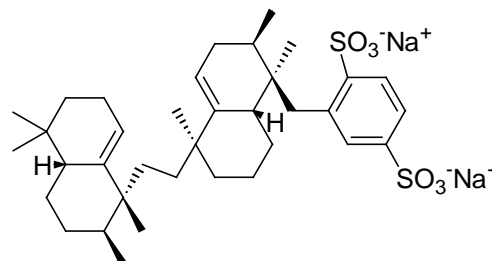
Avarol F



Illimaquinone

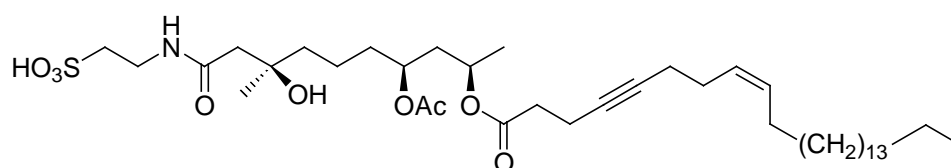
eukaryotischer α -DNA-Polymerase wurde bei den relevanten Konzentrationen nicht vermindert.⁸⁰ Aus *Hyatella intestinalis* (Spongiidae) wurde Hyatellaquinone, das sich nur durch die Stellung der Exomethylengruppe von Illimaquinone unterscheidet, als RTI isoliert.⁸¹ Verbindungen mit einem ähnlichen Kohlenstoffskelett aber mit größerem Terpenrest und sulfoniertem aromatischen Ring wurden

aus *Toxiclona toxius* (Demospongiae) gewonnen. Unter diesen war Toxiusol der Metabolit mit der stärksten Hemmung der HIV-1-RT, die selektiv die RDDP Funktion des Enzyms betraf.⁸² Eine andere Strukturklasse von RT-Hemmstoffen aus



Toxiusol

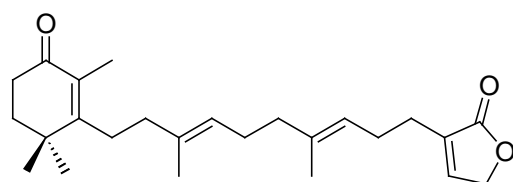
Schwämmen sind Fettsäurederivate mit Acetylguppen, wie z. B. Taurospingin A aus dem Schwamm *Hippospongia* sp. (Spongiidae) aus Okinawa. Taurospingin A hemmt HIV-RT



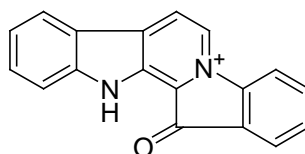
Taurospingin A

zwar relativ stark, jedoch nur unspezifisch.⁸³ Weitere Acetylguppen enthalten- de Fettsäuren

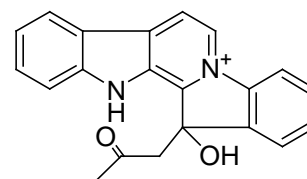
wurden in *Petrosia* sp. (Petrosiidae), einem Schwamm aus dem Roten Meer, gefunden: Petrosynol und Petrosolic Acid, die beide Hemmstoffe der Polymerase-Aktivitäten von HIV-1-RT darstellten.⁸⁴ Alkaloide aus Schwämmen wurden ebenfalls als HIV-RT-Hemmstoffe identifiziert. Aus einer aus dem Roten Meer stammenden *Verongia* sp. (Aplysinidae) wurde 3,5,8-Trihydroxy-4-quinolone isoliert, welches potente HIV-1-RT-Hemmaktivität aufweist.⁸⁵ Aus *Fascaplysinopsis reticulata* (Aplysinidae) von den Fiji-Inseln wurden drei neue HIV-1-RT-Hemmstoffe erhalten, alle jedoch mit schwacher Aktivität: Isodehydroluffariellolid, Fascaplysin und Homofascaplysin A Kation/Dehydroluffariellolide Diacid Anion.⁸⁶



Isodehydroluffariellolid

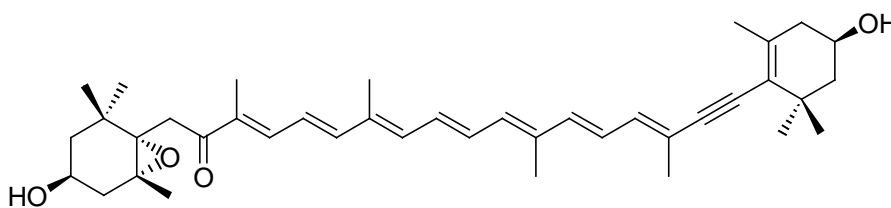


Fascaplysin



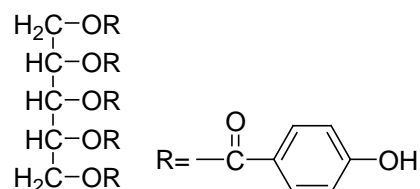
Homofascaplysin A Kation

Plakinidine A, ein Alkaloid aus einer *Plakortis* sp. (Plakinidae), hemmte die Aktivität von HIV-1-RT ebenfalls nur bei hohen Konzentrationen.⁸⁷ Das ungewöhnliche Carotinoid Halocynthiaxanthin, das aus einem Schwamm aus dem Roten Meer stammt, ist der einzige carotinoide RTI, der die Polymerase-Funktionen des Enzyms mit einer anderen Schwammmetaboliten vergleichbaren Potenz hemmte.⁸⁸



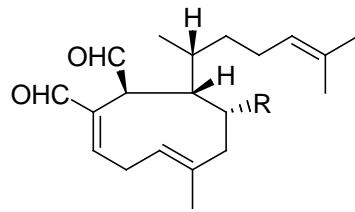
Halocynthiaxanthin

Weitere RTI aus dem Tierreich sind Homologe des Kelletinins I aus der Molluske *Kelletia kelletii* (Prosobranchia).⁸⁹ Kelletin A wurde aus der Schnecke *Buccinum corneum* (Buccinidae) isoliert. Kelletin A ist ein RTI, dessen Aktivität auf eine nicht-kompetitive Hemmung der RDDP zurückgeführt wurde.^{90, 91}



Kelletin A

Extrakte aus marinen Algen waren in Zellkulturtests antiviral wirksam,⁹² und auch die Hemmung von HIV wurde beschrieben.⁹³ Aus dem wässrigen Extrakt der Rotalge *Schizymenia pacifica* (Nemastomaceae), der die RTs von AMV und RLV hemmte, wurde ein Carrageenan isoliert, das Galactose (73%), 3,6-Anhydrogalactose (0.65%), und Sulfat (20%) ($M_r 2 \times 10^6$) enthält.⁹⁴ Die anschließenden biologischen Tests ergaben, dass das gereinigte Carrageenan AMV-RT und HIV-1-RT hemmte, sowie die HIV-Replikation *in vitro*.⁹⁵ Die Wirkstärke war mit anderen sulfatierten Polysacchariden vergleichbar, wie Heparinen, anderen Carrageenane und Dermatansulfat.⁹⁵ Der Wirkungsmechanismus der sulfatierten Polysaccharide wurde mit einer Hemmung der Virus-Zell-Adhäsion erklärt.¹⁶ Diese Verbindungsklasse besitzt jedoch keine Bedeutung als mögliche HIV-RT-Inhibitoren und sollte vor der detaillierten Untersuchung von Extrakten abgetrennt werden. Methoden zur Entfernung von solchen Substanzen aus wässrigen Extrakten vor dem Screening wurden beschrieben.⁹⁶ Das HIV-1-RT-hemmende Peyssonol A aus einer *Peyssonnelia* sp. (Peyssonneliaceae) ist ein bromiertes sesquiterpenoides Hydrochinon, ähnlich den Schwammmetaboliten mit prenylierter Hydrochinon-Struktur, jedoch mit einer Aldehyd-Gruppe substituiert.⁸¹ Aus *Gigartina tenella* (Gigartinaceae) wurde ein Sufoglykolipid als Hemmstoff der HIV-1-RT isoliert, das sich von den Sufoglykolipiden aus Cyanobakterien kaum unterscheidet, und deshalb auch hier nicht weiter untersucht wurde.⁹⁷ Die Diterpene Dictyodial und Hydroxydictyodial aus den Braunalgen *Dictyota dichotoma* und *D. patens* (Dictyotaceae) wurden als HIV-1-RT-Hemmstoffe



R = H *Dictyodial*
 R = OH *Hydroxydictyodial*

charakterisiert.⁹⁸ Wie Peyssonol A enthalten beide Metaboliten reaktive Aldehyd-Funktionen, die möglicherweise zu einer kovalenten Bindung an das Enzym führen und damit für die Hemmung verantwortlich sind.

1.3 Protein-Tyrosin-Kinase p56^{lck}

PTK sind Enzyme, die γ -Phosphatreste von ATP auf bestimmte Tyrosingruppen von Proteinen übertragen. Damit erfolgt die Weiterleitung eines Signals innerhalb einer Transduktionskaskade. Die Signalübertragung geschieht durch Membranen hindurch mittels Rezeptor-PTK, wie EGF-Rezeptor-PTK, oder intrazellulär durch NT-PTK. Eine erhöhte PTK-Aktivität konnte bei Tumorerkrankungen, Artherosklerose, Psoriasis und anderen entzündlichen Erkrankungen festgestellt werden.⁹⁹ Im menschlichen Genom wurden bislang aus einer sehr viel größeren Zahl dort vermutlich kodierter Tyrosin-Kinasen 32 NT-PTK identifiziert.¹⁰⁰ Sie werden aufgrund ihrer Sequenz und Domänen in verschiedene Familien eingeteilt; p56^{lck}, welches als zweite Zielstruktur für die Screeninguntersuchungen dieser Arbeit verwendet wurde, und auch das weiter unten genannte p59^{fynT}, gehören zur schon sehr genau beschriebenen Src-Familie.¹⁰¹

Erhöhte p56^{lck}-Konzentrationen und Mutationen des p56-Gens wurden bei T-Zell-Leukämien und Lymphomen und bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen festgestellt.¹⁰² Die PTK p56^{lck} kommt vor allem in T-Lymphozyten vor, wo sie eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Aktivierung sowie der T-Zell-Entwicklung spielt. Durch die Bindung eines Antigens an den Lymphozyten wird neben dem T-Zell-Rezeptor-Komplex auch der CD4-Rezeptor aktiviert, an welchen p56^{lck} gebunden ist. p56^{lck} wird phosphoryliert und die T-Zelle durch eine Signalkaskade aktiviert.¹⁰³ p56^{lck}-Hemmstoffe können die Aktivierung von T-Lymphozyten vermindern, und somit auch zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen die genannten Erkrankungen führen. Die enzymatisch aktiven Domänen aller PTK sind stark konserviert, und erschweren so das Auffinden von hochselektiven PTKI.¹⁰⁴ Ein großes „Überangebot“ von ATP in vivo schwächt die möglicherweise in vitro stark aktiven ATP-kompetitiven PTK-Hemmstoffe.¹⁰²

1.3.1 Natürliche und synthetische p56^{lck}-PTK-Inhibitoren

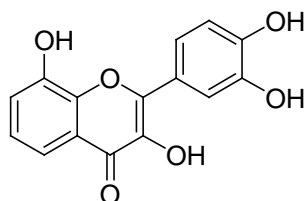
Die Wirkung einer großen Anzahl von Substanzen auf eine Vielzahl von PTK wurde untersucht. Für die meisten Untersuchungen wurden Rezeptor-PTK eingesetzt, nicht-membrangebundene PTK spielten eine untergeordnete Rolle. Dabei ließen sich viele stark wirksame PTKI identifizieren.^{102,105,106,107} Eine spezifische Hemmung von p56^{lck} zeigten nur wenige Substanzen, die in Tabelle 4 zusammengefasst und im folgenden beschrieben werden.

Tabelle 4: Aktivitäten der p56^{lck}-PTKI

Substanz	Quelle	IC ₅₀ -Wert (p56 ^{lck} -PTK) [μM]	Ref.
Quercetin	*	13	108
Hydroxyliertes Flavonderivat	*	14	108
Piceatannol	<i>Euphorbia lagascae</i>	66	109
trans-3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben	*	16	110
1-Methoxy-agroclavin	<i>Penicillium</i> sp.	8,5	111
Damnacanthal	<i>Damnacanthus</i> sp.	17 nM ^a / 620 nM ^b	112
PP1	*	5 nM	114
PP2	*	4 nM	114
Dibrom-5-methoxyindandionderivat	*	144 nM	115
Dibrom-5-aminoindandionderivat	*	32 nM	115
Dichlor-5-aminoindandionderivat	*	102 nM	115

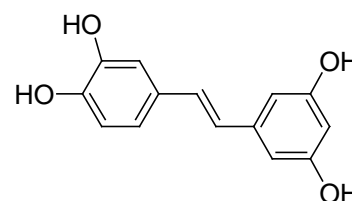
* Herkunftsorganismus nicht beschrieben, synthetisierte Derivate oder synthetische PTKI; ^a Autophosphorylierung; ^b Peptidsubstrat

Eine Untersuchung von Flavonoiden zeigte, dass Quercetin und andere hydroxylierte Flavone (siehe Abbildung) die PTK p56^{lck} hemmten.¹⁰⁸ Weitere Analysen ergaben jedoch, dass es sich hierbei um eine nicht selektive Hemmung handelt.¹⁰⁶ Auch Piceatannol, ein Stil-



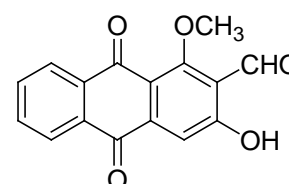
Hydroxyliertes Flavon

ben aus *Euphorbia lagascae* (Euphorbiaceae),¹⁰⁹ und synthetisierte Piceatannol-Analoga, von welchen trans-3,3',5,5'-Tetrahydroxystilben am potentesten wirkte,¹¹⁰ sind relativ schwach wirksam und wenig spezifisch. 1-Methoxy-agroclavine



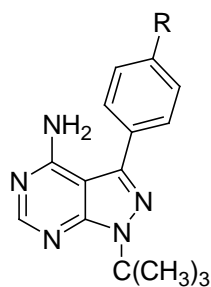
Piceatannol

aus *Penicillium* sp. wurde als p56^{lck}-PTKI identifiziert.¹¹¹ Diese Verbindung hemmte außerdem nur die ebenfalls in T-Lymphozyten vorkommende p59^{fynT}-PTK und EGF-Rezeptor-PTK in geringerem Maße als p56^{lck}. Das aus *Damnacanthus* sp. (Rubiaceae) isolierte und später synthetisierte Anthrachinon Damnacanthal ist ein sehr potenter p56^{lck}-Hemmstoff.¹¹² Verschiedene Rezeptor-PTK und andere PTK der Src-Familie wurden weniger stark bis kaum gehemmt. Trotz der reaktiven Aldehyd-Funktion des Damnacanthals war die PTK-Hemmung reversibel. In Zellsystemen war die Substanz jedoch inaktiv, was durch unspezifische Bindung an Membranlipide erklärt werden konnte.¹¹³



Damnacanthal

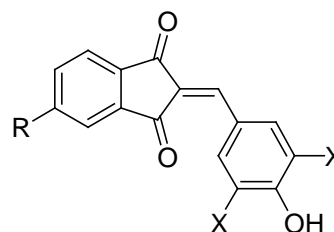
Weitere Substanzen mit starker PTK-Hemmaktivität wurden synthetisch hergestellt und sollen hier als Vergleich zu den Substanzen natürlichen Ursprungs ebenfalls beschrieben werden. Im nanomolaren Bereich liegen die IC₅₀-Werte von zwei Pyrazolopyrimidinen,



PP1 R = CH₃
PP2 R = Cl

p56^{lck}-Inhibitoren darstellen.¹¹⁵ Weitergehende Untersuchungen an Zellkulturen und damit biomedizinische Aussagen liegen über diese Verbindungen jedoch noch nicht vor.

PP1 und PP2, die sowohl p56^{lck} wie auch p59^{lynT} im Vergleich mit anderen PTK, z. B. EGF-Rezeptor-PTK, selektiv hemmten. In Untersuchungen mit kultivierten Zellen zeigten die Verbindungen ebenfalls Wirkungen und hemmten die T-Zell-Rezeptor-abhängige Proliferation von T-Lymphozyten.¹¹⁴ Ausgehend von Struktur-Wirkungs-Analysen bekannter PTKI wurden drei In-



Dibrom-5-methoxyindandion R = OCH₃ X = Br
Dibrom-5-aminoindandion R = NH₂ X = Br
Dichlor-5-aminoindandion R = NH₂ X = Cl

1.4 Ziel der Arbeit

Hemmstoffe der HIV-1-RT und p56^{lck}-PTK aus marinen Makro- und Mikroorganismen sollten isoliert und chemisch und biologisch charakterisiert werden, um so zu neuen Leitstrukturen für Arzneistoffe gegen AIDS bzw. PTK-abhängige Erkrankungen der T-Lymphozyten zu gelangen.

Aufgabe war die Untersuchung einer möglichst großen Anzahl Extrakte in HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Hemmtests. Hierfür sollten kommerziell erhältliche ELISA-Systeme verwendet werden, deren Eignung für die Untersuchung von komplexen Gemischen evaluiert werden sollte, und die dann in der AG G. König, TU Braunschweig, etabliert werden sollten. Aus in der biologischen Prüfung aufgefallenen „aktiven“ Extrakten sollten die hierfür verantwortlichen Substanzen mit Hilfe der Enzymhemmtests durch chromatographische Methoden (HPLC, SC und VLC) isoliert werden. Die Strukturen der Inhibitoren sollten mit Hilfe von physikalisch-chemischen Analysen, vor allem NMR-Spektroskopie und MS, aufgeklärt werden.

Zur Klärung des pharmazeutisch-medizinischen Potentials der erhaltenen Naturstoffe sollten HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Enzymhemmtests wie auch weitere biologische Prüfungen durchgeführt werden. Hierfür standen für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivitäten in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Testsysteme sowie durch Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen Zytotoxizitätstests, Systeme zur Prüfung der antiviralen, antiplasmodialen und Trypanosomen-hemmenden Aktivität zur Verfügung.

2 Material und Methoden

2.1 Im Screening untersuchte Organismen

2.1.1 Marine Makroorganismen

Die marinen Makroorganismen stammten aus unterschiedlichen klimatischen Regionen und verschiedenen Phyla des Tier- und Pflanzenreiches. Sie wurden in der Arktis und Antarktis, bei Spitzbergen, Helgoland, Amrum, in den Niederlanden, bei Teneriffa, Lanzarote, Malta, den Azoren, Dominica, in Australien, bei Hainan und Fiji in Tiefen von bis zu 20 m oder bei Ebbe gesammelt. Es wurden 17 Bryozoen (Bryozoa), 13 Seescheiden (Chordata), 37 Nesseltiere wie Weich- und Hornkorallen (Cnidaria), 2 Weichtiere (Mollusca), 93 Grün-, Braun- und Rotalgen (Phycophyta) und 78 Schwämme (Porifera) untersucht. Für die Aufstellung aller untersuchten Arten: siehe Anhang, Teil 1, 6.1.1.

Die Proben aus Fiji wurden sofort nach der Sammlung in EtOH 96% gelagert, die Algenproben des Alfred-Wegener-Institut waren gefriergetrocknet, alle anderen Proben wurden frisch eingefroren und bei -18°C aufbewahrt. Diese Organismen wurden gefriergetrocknet bzw. bei Konservierung mit EtOH aus der Lösung entnommen und mit CH₂Cl₂ und anschließend mit Methanol oder Methanol/H₂O (80/20, V/V) durch mehrfache und erschöpfende Mazeration bei 20°C jeweils 24 Stunden lang extrahiert. Durch Einengen am Rotationsverdampfer wurden lipophile und hydrophile Extrakte von jeder Probe erhalten.

2.1.2 Cyanobakterien

Die untersuchten Cyanobakterien stammten aus der Ostsee, dem Müggelsee, der Lüneburger Heide, La Réunion (Frankreich) und aus Cyanobakteriensammlungen der EA-WAG, Dübendorf, Schweiz, des Albrecht-von-Haller-Institutes für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen,¹¹⁶ des Max-Planck-Institutes für Ökologische Physiologie, Plön, und des Zentrums für Umweltforschung und Umwelttechnologie, Universität Bremen. Aus den gesammelten Organismen wurden Reinkulturen angelegt und diese wie die Cyanobakterien aus Sammlungen in Kultur gehalten. *Microcystis-aeruginosa*- und *Lyngbya*-Algenblüten aus dem Müggelsee bzw. von Orpheus Island (Australien) wurden direkt untersucht. Alle untersuchten 65 Stämme sind im Anhang (Teil 1, siehe 6.1.2) aufgelistet.

Die Cyanobakterienproben wurden in 200-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Salz-, Brack- oder Süßwassermedium bei 25°C kultiviert bis ausreichend Biomasse für die Extraktion vorlag.¹¹⁶ Anschließend wurden die Medien abgetrennt und die Cyanobakterien gefriergetrocknet. Durch Mazeration bei 20°C jeweils 24 Stunden lang mit CH₂Cl₂ (3 × 100 ml) und daran anschließend mit MeOH (3 × 100 ml) wurde erschöpfend extrahiert, und die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

2.1.3 Pilze

2.1.3.1 Isolierung, Kultivierung und Extraktion der Pilzstämme

Die bearbeiteten Pilze waren, mit Ausnahme der ebenfalls verwendeten Samenpflanze *Posidonia* sp., mit Algen oder Schwämmen assoziiert. Zusätzlich zu den unter 6.1.1 e) und f) genannten Algen bzw. Schwämmen wurde am Kap Suonio (Griechenland), in Moraira (Spanien), auf den Azoren, Helgoland, und an der deutschen Nord- und Ostseeküste weiteres Material ausschließlich zur Gewinnung von Pilzstämmen gesammelt: siehe Anhang, Teil 1, 6.1.3.1 a) und b).

Die Isolierung der Pilzstämme wurde von Höller im Detail beschrieben.¹¹⁷ Zum Screening wurden ausgewählte Stämme in 200-ml-Erlenmeyer-Kolben oder einer entsprechenden Menge Petrischalen und 50 ml unterschiedlicher Kulturmedien (vgl. 2.1.3.2) bei 20°C 14 Tage lang kultiviert. Flüssigkulturen wurden auf Infors Novotron Rundschüttlern (65 rpm) gehalten. Zur Extraktion wurden die Kulturen, bei Festmedien unter Zusatz von 50 ml H₂O, mit einem Ika Ultra-Turrax T25 homogenisiert und mit 3 × 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Insgesamt wurden 77 verschiedene Pilzisolats untersucht: siehe Anhang, Teil 1, 6.1.3.2.

2.1.3.2 Künstliches Meerwasser und Kulturmedien der Pilze

Künstliches Meerwasser (ASW) [g/kg]: KBr 0,1, NaCl 23,48, MgCl₂ × 6 H₂O 10,61, CaCl₂ × 2 H₂O 1,47, KCl 0,66, SrCl₂ × 6 H₂O 0,04, Na₂SO₄ 3,92, NaHCO₃ 0,19, H₃BO₃ 0,03.

Kulturmedien:

Medium B [g/l]: Biomalz 20,0, Agar 6,8.

Medium Bs [g/l]: Biomalz 20,0, ASW 800,0, Agar 6,8.

Medium Bfl [g/l]: Biomalz 20,0, ASW 800,0.

Medium MS [g/l]: Malzextrakt 30,0, Pepton aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut 3,0, Agar 7,6, ASW 800,0 (pH 5,5).

2.1.4 Bakterien

Bakterienisolate wurden aus den Bryozoen *Electra pilosa* und *Flustra foliacea*, der Seescheide *Botryllus schlosseri* und dem Schwamm *Leucosolenia botryoides* gewonnen. Die Bakterien wurden im Rahmen des Verbundprojektes „Naturstoffe aus kultivierbaren marinen Organismen“ bei 28°C für 70 Stunden auf Rundschüttlern in 500-ml-Erlenmeyer-Kolben kultiviert und als Bakterienpellet dem Screening zur Verfügung gestellt. Die Pellets wurden gefriergetrocknet und durch Mazeration bei 20°C für jeweils 24 Stunden mit CH₂Cl₂/MeOH (4/1, V/V) (2 × 50 ml) extrahiert. Proben von *Rhodobium marinum* und *Rhodobacter* sp. wurden ebenso als Bakterienpellet erhalten und mit 3 × 100 ml MeOH bei 20°C für jeweils 24 Stunden mazeriert. Pellets von *Sulfitobacter-pontiacus*-Kulturen in unterschiedlichen Wachstumsphasen wurden mit 3 × 100 ml CH₂Cl₂ und 3 × 100 ml MeOH bei 20°C für jeweils 24 Stunden mazeriert. Als Kulturmedium wurde Marine Broth Medium 10% mit auf die Originalkonzentration angepasstem Salzgehalt (NaCl: 19 g/l) und einer zusätzlichen Energiequelle (meist Mannitol) verwendet. Alle 35 Extrakte wurden am Rotationsverdampfer getrocknet und in den Enzymhemmtests untersucht.

2.1.5 Samenpflanzen

Alle 28 untersuchten Pflanzen stammten aus tropischen Regionen Zaires und des Sudan und wurden unter Berücksichtigung der volksmedizinischen Verwendung gegen Malaria oder fieberhafte Erkrankungen ausgewählt (siehe Anhang, Teil 1, 6.1.4).

Die gesammelten Pflanzenteile wurden an der Luft getrocknet und anschließend extrahiert. Die Pflanzen aus Zaire wurden zuerst mit lipophilen Lösungsmitteln (EtOAc oder CH₂Cl₂) und dann mit Methanol oder Methanol/H₂O (80/20, V/V) durch Mazeration bei 20°C erschöpfend extrahiert. Die Pflanzen aus dem Sudan wurden nur mit Methanol/H₂O (80/20, V/V) behandelt. Alle Extrakte wurden an Rotationsverdampfern bis zur Trockne eingengt.

2.2 Herkunft der Reinsubstanzen

Die Hemmung von HIV-1-RT und p56^{lck}-PTK durch Reinsubstanzen wurde bestimmt. Diese Naturstoffe wurden aus den unter 6.1.1 genannten marinen Makroorganismen, aus Pilzen (siehe 6.1.3.2) und aus Flechten isoliert. Eine Charakterisierung der Substanzen erfolgte im Arbeitskreis G. König, TU Braunschweig (siehe Tabelle 5). Die Isolierung von Reinsubstanzen aus *Hyrtios* cf. *erecta* (siehe 3.2.1), *Xestospongia rosariensis* (siehe 3.2.2), *Dictyota volubilis* (siehe 3.2.4), *Ulocladium botrytis* (siehe 3.2.5) und *Lobophytum crassum* (siehe 3.2.6) wird in dieser Arbeit beschrieben.

Tabelle 5: Anzahl und Quellorganismen der im HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Test untersuchten Reinsubstanzen

Organismengruppe	Anzahl der Reinstoffe	Quellorganismus
Chordatiere	4	<i>Didemnum</i> sp. ¹¹⁸
Nesseltiere	7	<i>Capnella</i> sp., <i>Lobophytum crassum</i> (vgl. 3.2.6) und <i>Porites</i> sp. ¹¹⁸
Blualgen	2	<i>Fischerella ambigua</i> ⁷⁰
Weichtiere	12	<i>Aplysia dactylomela</i> ¹¹⁹
Algen	58	<i>Delisea</i> sp., ¹²⁰ <i>Dictyota pardalis</i> , ^{121,122} <i>Dictyota divaricata</i> , ^{123,124} <i>Dictyota volubilis</i> (vgl. 3.2.4) <i>Laurencia rigida</i> , ¹²⁵ <i>Laurencia obtusa</i> , ¹²⁶ <i>Plocamium costatum</i> , ¹²⁷ <i>Plocamium hamatum</i> , ¹²⁸ <i>Stypopodium zonale</i> , ¹²⁹ und aus 2 nicht bestimmten Rotalgen
Schwämme	30	<i>Acanthella klethra</i> , ^{130,131} <i>Cymbastela hooperii</i> , ¹³² <i>Iotrochota birotulata</i> , <i>Laxosuberitis rugosa</i> , ¹³³ <i>Tedania anhelans</i> , ¹³³ <i>Dactylospongia elegans</i> ¹³⁴ , <i>Xestospongia rosariensis</i> (vgl. 3.2.2) und <i>Hyrtios</i> cf. <i>erecta</i> (vgl. 3.2.1)
Pilze	30	<i>Ascochyta salicornia</i> ¹³⁵ , <i>Coniothyrium</i> sp. ¹³⁶ , <i>Drechslera dermatioidea</i> , <i>Microsphaeropsis</i> sp. ¹³⁶ , <i>Ulocladium botrytis</i> ^{137,138} (vgl. 3.2.5) und <i>Varicosporina ramulosa</i> ¹³⁷
Flechten	4	<i>Lecanura mutalis</i> ¹³⁹ , <i>Letharia columbiana</i> ¹³⁹ , <i>Stereocaulon vesuvium</i> ¹³⁹

2.3 Organismen für die Isolierung von Naturstoffen

2.3.1 Makroorganismen

Der Schwamm *Hyrtios* cf. *erecta* Keller 1889 wurde in Nananu-I-Ra, Fiji, in einer Tiefe von 15 m gesammelt und anschließend mit EtOH 96% konserviert. Die taxonomische Bestimmung nahm J. N. A. Hooper, Queensland Museum, South Brisbane, Australien vor. Ein Muster der Probe wurde unter der Nummer CT 198 PPP im Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig, hinterlegt. Zur Extraktion wurde die EtOH-Lösung entfernt, zur

Trockne eingeengt, in 0,2 l MeOH/H₂O (1/1, V/V) aufgenommen und mit CH₂Cl₂ (3 x 0,1 l) extrahiert. Der Schwamm wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 0,4 l) und anschließend mit MeOH (3 x 0,4 l) bei 20°C jeweils 24 h lang mazeriert. Die MeOH/H₂O-Phase und MeOH-Extrakte und alle CH₂Cl₂-Phasen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Es wurden 1,9 g MeOH-Extrakt und 5,2 g CH₂Cl₂-Extrakt erhalten. Nach der Extraktion wurde der Schwamm getrocknet und gewogen (80 g). Der CH₂Cl₂-Extrakt wurde durch VLC an Kieselgel in 15 Fraktionen von jeweils 80 ml getrennt (Gradientenelution von Petrolether über EtOAc zu MeOH). Durch Normalphasen-HPLC wurden vier VLC-Fraktionen getrennt. Fraktion 3 (EtOAc/Petrolether 3/97, V/V) und Fraktion 4 (EtOAc/Petrolether 7/93, V/V) enthielten die Sesterterpene **1** (3 mg) und **2** (3 mg). Aus den Fraktionen 5 und 6 (EtOAc/Petrolether 20/80, V/V) wurde Isodehydroluffariellolid (**3**) (15 mg) isoliert. Die Fraktionen 11 und 14 wurden durch RP-HPLC getrennt (Gradientenelution von MeOH/H₂O 45/55 zu 100/0, V/V, 0,05% Trifluoressigsäure), und Homofascaplysin A (**4**) (25 mg), und Fascaplysin (**5**) (50 mg) erhalten.

Der Schwamm *Xestospongia rosariensis* Zea & Rutzler 1985 wurde in Dominica (Lauro Club Riff) gesammelt (Probennummer: CT 193 F). Die taxonomische Einordnung des Schwammes erfolgte durch R. Desqueyroux-Faundez, Musée d'Histoire Naturelle, Genf, Schweiz. Der Schwamm wurde gefriergetrocknet (125 g) und mit CH₂Cl₂ (3 x 1,2 l) und anschließend mit MeOH (3 x 1,2 l) bei 20°C jeweils 24 h lang mazeriert. Nach dem Trocknen am Rotationsverdampfer wurden 5,8 g CH₂Cl₂-Extrakt bzw. 31,6 g MeOH-Extrakt erhalten. Der MeOH-Extrakt wurde in 200 ml MeOH/H₂O (1/1, V/V) gelöst und mit 3 x 200 ml n-Butanol extrahiert. Nach Trocknen am Rotationsverdampfer wurden 12,1 g n-Butanol-Extrakt ausgewogen. 8 g dieses Extraktes wurden in CH₂Cl₂/Hexan (1/1, V/V) gelöst und durch VLC (Gradientenelution von CH₂Cl₂/Hexan (1/1, V/V) über CH₂Cl₂ zu MeOH, 1% NH₃/MeOH und 1% HCl/MeOH) in 14 Fraktionen zu jeweils 150 ml getrennt. Fraktion 14 wurde durch nochmalige VLC an Kieselgel gereinigt (Elutionsmittel CHCl₃/MeOH/H₂O 65/30/5, V/V/V) und ergab 4 Fraktionen von je 120 ml. Fraktion 2 wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und ergab 45 mg Halitoxin (**6**).

Der Schwamm *Amphimedon* sp. (Artnr.: 2070; entsprechend der Queensland Museum Sessile Marine Invertebrate Artnummerierung) wurde in Nananu-I-Ra, Fiji, in einer Tiefe von 4–18 m gesammelt und anschließend mit EtOH 96% konserviert. Die Taxonomie nahm J. N. A. Hooper, Queensland Museum, South Brisbane, Australien vor. Ein Muster der Probe wurde unter der Nummer CT 198 OO im Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig, hinterlegt. Zur Extraktion wurde die EtOH-Lösung entfernt und diese mit CH₂Cl₂ (2 x 0,5 l) durch Flüssig-Flüssig-Verteilung extrahiert. Der Schwamm wurde mit CH₂Cl₂ (3 x 4 l) und anschließend mit MeOH (3 x 4 l) bei 20°C jeweils 24 h lang mazeriert.

Die CH_2Cl_2 -Phasen wurden vereinigt und alle Extrakte an Rotationsverdampfern bis zur Trockne eingengt. Es wurden 17 g CH_2Cl_2 -Extrakt, 43 g MeOH-Extrakt und 15 g EtOH-Extrakt erhalten. Nach der Extraktion wurde der Schwamm getrocknet und gewogen (220 g). Der CH_2Cl_2 -Extrakt wurde durch VLC an Kieselgel in 8 Teile von jeweils 80 ml fraktioniert (Gradientenelution von Petrolether über EtOAc und MeOH zu MeOH/ H_2O 50/50, V/V, 1% NH_3). Durch Normalphasen-HPLC wurden zwei VLC-Fractionen aufgereinigt. Fraktion 3 (Aceton/Petrolether 16/84, V/V) enthielt p-OH-Benzaldehyd (**7**) (9 mg) und Fraktion 5 (Aceton/Petrolether 19/81, V/V) Benzoesäure (**8**) (18 mg) und Phenyllessigsäure (**9**) (15 mg). In ^1H -NMR-Spektren des MeOH-Extraktes konnten 3-Alkylpyridin-Derivate ähnlich Halitoxin (**6**) nachgewiesen werden.

Die Braunalge *Dictyota volubilis* Kutzing wurde in Magnetic Island, Australien gesammelt (Probennummer: MI 895 A). Die Taxonomie wurde durch I. Price, James Cook University, Townsville, Australien bestätigt. Der Organismus wurde gefriergetrocknet (280 g), mit CH_2Cl_2 (5 x 1,0 l) und anschließend mit MeOH (5 x 1,0 l) bei 20°C jeweils für 24 h mazeriert. Die eingengten MeOH-Extrakte wurden zwischen Methanol/ H_2O (1/1, V/V) und CH_2Cl_2 verteilt. Die vereinigten CH_2Cl_2 - und MeOH/ H_2O -Phasen wurden an Rotationsverdampfern bis zur Trockne eingengt. Es wurden 15,3 g CH_2Cl_2 -Extrakt und 65 g MeOH/ H_2O -Extrakt erhalten. Durch Trennung des CH_2Cl_2 -Extrakt an Kieselgel mit VLC (Gradientenelution von Hexan über EtOAc zu MeOH) wurden 6 Fractionen von jeweils 200 ml erhalten. VLC-Fraktion 2 wurde durch wiederholte VLC an Kieselgel (Gradientenelution von Hexan über EtOAc zu MeOH) in 11 Fractionen von jeweils 100 ml getrennt. Aus VLC-Fraktion 2/2 wurde durch Normalphasen-HPLC (EtOAc/Hexan 7/93, V/V) Dictyodial (**10**) (120 mg) erhalten. Aus VLC-Fraktion 2/3 wurde mittels Normalphasen-HPLC (EtOAc/Hexan 10/90, V/V) Dictyotalid B (**11**) (9 mg) und 10-Acetoxy-18-hydroxy-2,7-dolabelladien (**12**) (23 mg) erhalten, letzteres wurde durch nochmalige HPLC-Trennung an Kieselgel (Aceton/Hexan 10/90, V/V) gereinigt. Aus der VLC-Fraktion 2/5 wurden nach HPLC-Trennung (EtOAc/Hexan 15/85, V/V) 4-Hydroxydictyodial (**13**) (instabil, ca. 5 mg) und Dictyol B (**14**) (25 mg) isoliert. Nach der ersten VLC-Trennung wurden die Fractionen 3 und 4 (3+4) vereinigt und durch weitere VLC an Kieselgel (Gradientenelution von Hexan über EtOAc zu MeOH) in 9 Fractionen von jeweils 100 ml getrennt. Aus den hierbei erhaltenen Fractionen 3+4/4 und 3+4/5 wurden nach HPLC-Trennung an Kieselgel (EtOAc/Hexan 14/86, V/V) Acetoxycrenulid (**15**) (23 mg) und Fucosterol (**16**) (140 mg) gewonnen. VLC-Fraktion 3+4/9 wurde durch RP-VLC (Gradientenelution von H_2O -MeOH, 10/90, V/V, über MeOH zu Aceton) in 4 Fractionen getrennt, und durch anschließende VLC an Kieselgel (Gradientenelution von EtOAc/Hexan 5/95, V/V, über EtOAc und Aceton zu MeOH) wurde Dictyol C (**17**) (4 mg) gewonnen.

Proben der Weichkoralle *Lobophytum crassum* Von Marenzeller 1886 (Alcyoniidae) wurden bei Ebbe in Magnetic Island, Australien, gesammelt (Probennummer: CT 293 N). Die taxonomische Bestimmung wurde von Phil Alderslade, Museum and Art Galleries of the Northern Territory, Darwin, Australien, vorgenommen, ein Belegexemplar des Organismus wurde dort unter der Nummer NTM C 12523 hinterlegt. Die Weichkoralle wurde gefriergetrocknet (150 g) und mit CH_2Cl_2 (3 x 0,6 l) und anschließend mit MeOH (3 x 0,6 l) bei 20°C jeweils 24 h lang mazeriert. Es wurden 7,3 g der CH_2Cl_2 -Fraktion und 15,0 g MeOH-Extrakt erhalten. Der MeOH-Extrakt wurde zwischen H_2O (0,2 l) und CH_2Cl_2 (3 x 0,2 l) verteilt. Nach Vereinigen und Trocknen aller CH_2Cl_2 -Fraktionen am Rotationsverdampfer wurden 8,2 g CH_2Cl_2 -Extrakt erhalten. Dieser wurde durch VLC (Gradientenelution von Hexan über EtOAc zu MeOH) in 13 Teile zu jeweils 80 ml fraktioniert. Drei VLC-Fractionen wurden mittels Normalphasen-HPLC gereinigt. Aus Fraktion 7 (EtOAc/Hexan 3/97, V/V) wurden der Cembranmethylester (**23**) (10 mg) und das Eudesmanderivat (**25**) (15 mg) und aus Fraktion 8 (EtOAc/Hexan 8/92, V/V) die Eudesmanderivate (**24**) (10 mg) und (**26**) (>100 mg) erhalten. Aus Fraktion 9 (EtOAc/Hexan 9/91, V/V) wurde 2S,7S,8S-Sarcophytoxid (**27**) (350 mg) isoliert.

Von der aus der Antarktis stammenden Rotalge *Gymnogongrus antarcticus* wurden 20 g Biotrockenmasse von U. Karsten, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, zur Verfügung gestellt. Die Alge wurde mit 400 ml CH_2Cl_2 versetzt und mit einem Ika Ultra-Turrax T25 zerkleinert und anschließend nacheinander mit CH_2Cl_2 (3 x 200 ml) und MeOH (3 x 200 ml) bei 20°C jeweils 24 h lang mazeriert. Es wurden 300 mg CH_2Cl_2 - und 40 mg MeOH-Extrakt erhalten. Der CH_2Cl_2 -Extrakt wurde durch VLC (Gradientenelution von Petrolether über EtOAc zu MeOH) in 12 Fraktionen zu jeweils 80 ml aufgeteilt. Die vereinigten VLC-Fractionen 5-7 wurden mit RP-HPLC (Gradientenelution von MeOH/ H_2O 50/50 zu 100/0, V/V) analysiert.

2.3.2 Kultivierung, Extraktion und Aufarbeitung der Pilze

Ulocladium botrytis (Deuteromycetes) wurde aus dem Schwamm *Callyspongia vaginalis* Lamarck 1814 von U. Höller isoliert und von S. Dräger, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig, identifiziert (Stammnummer: 193 A 4).¹¹⁷ Der Pilz wurde auf 7,5 l Medium B (siehe 2.1.3.2, Kulturmedien) 15 Tage bei 20°C in Fernbach- und Penicillium-Kolben kultiviert. Zur Extraktion wurden jeweils 250 ml H_2O und 500 ml Medium mit Mycel mit einem Ika Ultra-Turrax T25 homogenisiert, zerkleinert und mit EtOAc (4 x 250 ml) extrahiert. Die EtOAc-Phasen wurden am Rotationsverdampfer getrocknet und ergaben 3,6 g Extrakt. Die VLC-Trennung des Extraktes an Kieselgel (Gradientenelution von Cyclohexan über EtOAc

und MeOH zu MeOH/H₂O 1/1, V/V) ergab 12 Fraktionen zu jeweils 150 ml (VLC 1). Die mit Cyclohexan/EtOAc ca. 1/1, V/V eluierte Fraktion 6 wurde nochmals an Kieselgel durch VLC in 8 Fraktionen zu 80 ml getrennt (Gradientenelution von Cyclohexan/EtOAc 80/20, V/V, zu MeOH) (VLC 2). Aus den Fraktionen 2+3 und 4+5 der 2. VLC-Trennung wurden nach Normalphasen-HPLC (Aceton/Petrolether 33/67, V/V (HPLC 2) bzw. 31/69, V/V (HPLC 3)) Ulocladol (**19**) (9 mg) und Clonostachydiol (**20**) (30 mg) erhalten. HPLC-Trennung an Kieselgel (Aceton/Cyclohexan 30/70, V/V) von Fraktion 6 der 2. VLC-Trennung ergab Botrallin (**21**) (9 mg) (HPLC 1). Fraktion 7 der 2. VLC-Trennung wurde an RP-Material in einer offenen Säule (sonstige Bedingungen wie bei VLC, siehe 2.5.2) in 80 Fraktionen von jeweils 7 ml getrennt (Gradientenelution von MeOH/H₂O 1/1, V/V, zu MeOH). Die SC-Fraktionen 1-12 wurden vereinigt und durch RP-HPLC in 13 Fraktionen getrennt (Gradientenelution von MeOH/H₂O 80/20 zu 100/0) (HPLC 4).

Epicoccum sp. (Deuteromycetes) wurde aus der Braunalge *Fucus vesiculosus* von C. Wegner isoliert und von S. Dräger, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig, identifiziert (Stammnummer: N 1-12). Der Pilz wurde in 10 l Medium Bfl (siehe 2.1.3.2, Kulturmedien) 25 Tage bei 20°C kultiviert. Die Kulturen wurden in 1-l-Erlenmeyer-Kolben und jeweils 500 ml Medium auf Infors Novotron Rundschüttlern (65 rpm) gehalten. Zur Extraktion wurden Medium und Mycel mit einem Ika Ultra Turrax T25 homogenisiert und mit insgesamt 30 l EtOAc extrahiert. Die am Rotationsverdampfer getrockneten EtOAc-Phasen ergaben 600 mg Extrakt. Dieser wurde durch VLC (Gradientenelution von Petrolether über EtOAc und MeOH zu MeOH/H₂O 10/90, V/V, 0,2% Trifluoressigsäure) in 10 Fraktionen zu jeweils 90 ml aufgeteilt (VLC 1). Die hierbei mit Petrolether/EtOAc 40/60, V/V erhaltene VLC-Fraktion 5 wurde durch RP-HPLC (Gradientenelution von MeOH/H₂O 50/50 zu 100/0) getrennt (HPLC 1). Aus der mit Petrolether/EtOAc 30/70, V/V erhaltenen VLC-Fraktion 6 wurde nach RP-HPLC (Gradientenelution von MeOH/H₂O 50/50 zu 100/0) (HPLC 2) und nochmaliger RP-HPLC der hierbei erhaltenen Fraktion 1 (Gradientenelution von MeOH/H₂O 10/90 zu 100/0) Uracil (**22**) (3 mg) erhalten (HPLC 3). Die bei VLC 1 erhaltenen Fraktionen 7–9 (Petrolether/EtOAc 20/80, V/V bis EtOAc/MeOH 90/10, V/V) wurden vereinigt. RP-VLC-Trennung von VLC 7-9 (Gradientenelution von MeOH/H₂O 20/80 über 100/0 zu MeOH/EtOAc 50/50) ergab 7 Fraktionen (VLC 2), die durch RP-HPLC (Gradientenelution von MeOH/H₂O 50/50 zu 100/0) fraktioniert wurden.

2.4 Biologische Tests

2.4.1 HIV-1-RT-Test

Die Hemmung der HIV-1-RT wurde mit dem Reverse Transcriptase Assay Kit, non-radioactive (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1468120) nach Eberle und Seibl bestimmt.¹⁴⁰ Extrakte und Reinsubstanzen wurden in DMSO/Lysis-Puffer (10/90, V/V) entsprechend einer Konzentration von 200 µg/ml gelöst. Jeweils 20 µl Probelösung, Lysis-Puffer und Reaktionsgemisch aus dem Kit wurden in Mikroreaktionsgefäßen 1 Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsmischung enthielt 66 µg/ml Extrakt bzw. Reinsubstanz, 1 ng rekombinante HIV-1-RT, und 3,3% DMSO. Lysis-Puffer (pH 7,8) bestand aus 50 mM Tris, 80 mM KCl, 2,5 mM DTT, 0,75 mM EDTA und 0,5% Triton-X 100. Das Reaktionsgemisch aus dem Kit setzte sich aus Template-Primer-Hybrid poly(A)*oligo(dT) (600A_{260nm}/ml), 8 µM Thymidin-5'-Triphosphat (dTTP), 8 µM Digoxigenin- und Biotin-markiertem 2'-Desoxy-uridin-5'-Triphosphat (dUTP), 40 µM Tris×HCl, 230 mM KCl, 24 mM MgCl₂ und 8 mM DTT zusammen. Nach Überführen des Reaktionsgemisches in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten und Reaktion mit Anti-Digoxigenin-Peroxidase wurde die Enzymaktivität kolorimetrisch mit ABTS^R-Reagenz bei $\lambda = 415$ nm und Untergrundkorrektur bei $\lambda = 490$ nm an einem ELISA Reader bestimmt (Rainbow, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH). Als Positivkontrollen wurden in jeder Testreihe 0,5 nM AZT-Triphosphat oder 10 µM Foscarnet in DMSO/Lysis-Puffer (10/90, V/V) eingesetzt. Extrakte, welche die Enzymaktivität auf 80% oder weniger relativ zu einer Negativkontrolle (Reaktionsmischung ohne Inhibitor bzw. Extrakt) reduzierten, wurden als aktiv angesehen. Zur Charakterisierung von Reinsubstanzen wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt.

2.4.2 p56^{lck}-Protein-Tyrosin-Kinase-Test

Die p56^{lck}-Tyrosin-Kinase-Hemmung wurde mit dem Tyrosine Kinase Assay Kit, non-radioactive (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1534505) bestimmt. Aus Extrakten und Reinsubstanzen wurden Probelösungen (1 µg/ml, DMSO/H₂O (1/1, V/V)) hergestellt. Die Probelösungen wurden mit 1 U p56^{lck}-Tyrosin-Kinase, 1µM TK-Substrat II (Biotin-markiert), 1mM ATP, 10 mM MgCl₂, 20 µl Verdünnungs-Puffer und 20 µl Assay-Puffer 60 bis 80 Minuten bei 30°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch enthielt 200 µg/ml Extrakt bzw. Reinsubstanz und 10% DMSO. Der Verdünnungs-Puffer (pH 7,0) bestand aus 25 mM HEPES, 10% Glycerol und 0,1% Ethylphenolpolyethylen-Glykolether (NP-40^R). Der Assay-Puffer (pH 7,5) bestand aus 250 mM Tris, 25 mM NaF, 2,5 mM EDTA-Na₂, 4,0 mM EGTA, 5 mM DTT und 150 µM

Na_3VO_4 . Nach Überführen des Gemisches in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten und Reaktion mit Anti-Phosphotyrosin-Peroxidase wurde die Enzymaktivität kolorimetrisch mit ABTS^R-Reagenz bei $\lambda = 415 \text{ nm}$ und Untergrundkorrektur bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ mit einem ELISA Reader bestimmt (Rainbow, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH). Als Positivkontrolle wurde in jeder Testreihe 3 mM Piceatannol eingesetzt. Negativkontrollen enthielten keine Hemmstoffe, der Leerwert wurde ohne Hemmstoffe und ohne Enzym bestimmt. Extrakte, welche die Enzymaktivität auf 50% oder weniger im Vergleich mit der Negativkontrolle verminderten, wurden als aktiv angesehen. Zur Charakterisierung von Reinsubstanzen wurden individuell angepasste Konzentrationen eingesetzt.

2.4.3 Agar-Diffusions-Test

Agar-Diffusions-Tests wurden ausgeführt wie von Schulz *et al.* beschrieben.¹⁴¹ Testorganismen waren die Bakterien *Bacillus megaterium* de Bary (grampositiv) und *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chambers (gramnegativ), die Pilze *Ustilago violacea* (Pers.) Roussel (Uromyces), *Mycotypha microspora* Fenner (Zygomycetes), *Eurotium repens* Corda (Ascomycetes) und *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Deuteromycetes), und die Mikroalge *Chlorella fusca* Shih Krauss (Chlorophyceae). Es wurden jeweils 50 µg Testsubstanz auf sterilisierte Antibiotika-Testplättchen (Schleicher & Schüll 2668) aufgetragen, die dann auf die entsprechenden Agarmedien aufgebracht wurden. Die Radien der Hemmzonen wurden ausgehend vom Rand des Filterplättchens gemessen. Eine Wachstumshemmung (WH) des Testkeimes lag vor, wenn nur wenige Kolonien in der Hemmzone entdeckt, eine Totalhemmung (TH), wenn in der Hemmzone kein Wachstum mehr festgestellt wurde.

2.4.4 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität von Reinstoffen aus *Lobophytum crassum*, *Hirtios cf. erecta* und *Ulocladium botrytis* wurde mit dem MTT-Zellvitalitätstest (Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 1465007) auf FRhK-4-Zellen getestet.¹⁴² Weitere Zytotoxizitätstests wurden im Rahmen der Plasmodium- und Trypanosoma-Tests mit Rattenskelettmuskel-Myoblasten (L-6) und Makrophagen aus Mäuseperitoneum durchgeführt.¹⁴⁸ Die Zytotoxizität von Halitoxin (6) aus *Xestospongia rosariensis* wurde mit KB-Zellen bestimmt.¹⁴³

2.4.5 Antivirale Aktivität auf Hepatitis-A-Virus

Fascaplysin (**5**), Ulocladol (**19**) und Sarcophytoxid (**27**) wurden hinsichtlich einer antiviralen Wirkung auf verschiedene HAV-Varianten untersucht. Hierfür wurden FRhK-4-Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und mit 100 µl einer Viruskonzentration von 5×10^5 TCID₅₀/ml der Variante HAV-PI oder 2×10^7 TCID₅₀/ml der cytopathogenen Variante HAVcytHB1.1 infiziert. Zusätzlich wurden mit HAV/7 persistent infizierte FRhK-4-Zellen verwendet. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch anhand der Zellmorphologie über 21 Tage, sowie durch indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von HAV-Antigen 21 Tage nach der Infektion.

2.4.6 Hemmung von *Plasmodium falciparum*

Die Aktivität von Reinstoffen aus *Hyrtios* cf. *erecta* wurde gegen *Plasmodium falciparum* (Stämme: K1, NF54) bestimmt. Die Tests wurden wie von Ridley *et al.* beschrieben nach dem Protokoll von Desjardins *et al.* durchgeführt.^{144,145} Die antiplasmodiale Aktivität von Halitoxin (**6**) aus *Xestospongia rosariensis* wurde gegen *Plasmodium falciparum* (Stamm: FCR3F86) getestet.¹⁴⁶

2.4.7 Hemmung von *Trypanosoma brucei* ssp. *rhodesiense* und *T. cruzi*

Die Wirkungen von Reinstoffen auf die Erreger der Schlafkrankheit, *Trypanosoma brucei* ssp. *rhodesiense*, und der Chagas-Krankheit, *Trypanosoma cruzi*, wurden wie in der Literatur beschrieben bestimmt.^{147,148}

2.5 Chromatographie

2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Für die DC wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 5554) oder SIL RP-18W/UV 254 (Macherey-Nagel) eingesetzt. Die Chromatogramme wurden bei Raumtemperatur und ohne Kammersättigung entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 254$ und 365 nm) und bei Tageslicht nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (1 g Vanillin / 100 ml H₂SO₄) mit anschließendem Erhitzen auf 105°C. Alkaloide wurden nach Be-

sprühen mit Dragendorff's Reagenz detektiert (Lösung A: 0,85 g $\text{BiO}(\text{NO}_3) \times \text{H}_2\text{O}$, 10 ml Eisessig, 40 ml H_2O ; Lösung B: 20 g KJ, 50 ml H_2O ; Lösung A und Lösung B wurden 1:1 gemischt (Stammlösung) und jeweils frisch mit 2 ml Eisessig und 10 ml H_2O / ml Stammlösung verdünnt).

2.5.2 Vakuum-Liquid-Chromatographie

Für die Normalphasen-VLC wurde Kieselgel 60 (Korngröße 63-200 μm , Merck 7734) und für die RP-VLC Polyprep 60-50 C18 (Macherey-Nagel 71150) als Sorbens verwendet. Die Säulen wurden mit der entsprechenden Menge stationärer Phase trocken gefüllt und vor dem Auftragen der Probe mit dem vorgesehenen Fließmittel äquilibriert.

2.5.3 Hochdruckflüssigchromatographie

Für präparative HPLC-Trennungen an Normalphasen wurde eine Waters Chromatographie-Pumpe, ein Knauer Differential-Refraktometer, ein Rheodyne 7725i Injektionssystem und ein Linseis L 200 E Schreiber benutzt. Trennungen an RP wurden an einem Merck-Hitachi-System durchgeführt, das mit einer L-6200A Intelligent Pumpe, einem L-4500A Dioden-Array-Detektor und einem D-6000A Interface ausgestattet war und mit D-7000 HSM Software gesteuert wurde.

Als Trennsäulen wurden Vertex-Säulen (250 \times 8 mm, Knauer) verwendet. Für die Normalphasen-HPLC wurden LiChrospher Si 60-5 (Merck) und Lichrosorb Si 60-5 (Merck) und für die RP-HPLC Spherisorb S ODS 2-5 (Phase Separation) und Eurospher 100-5 C-18 (Knauer) eingesetzt. Die Elutionsmittel wurden im Vakuum entgast, die Proben darin aufgenommen und bei Flussraten von 2,0 ml/min (Normalphasen) und 1,2 - 1,5 ml/min (RP) getrennt.

2.6 Strukturaufklärung

Zur Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen wurden ein- und zweidimensionale NMR-, UV- und IR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Polarimetrie angewendet. Identität mit in der Literatur beschriebenen Strukturen wurde durch Vergleich der ^1H -, ^{13}C -NMR-Daten und der spezifischen optischen Drehung α_D festgestellt. Strukturen wurden als

neu angesehen, wenn kein Literaturzitat in den online-Datenbanken Beilstein (durch Beilstein Crossfire Server Software Version 4.0, Beilstein Institut für Literatur in der Organischen Chemie) und Chemical Abstracts gefunden werden konnte.

2.6.1 NMR-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektren von Extrakten und Reinsubstanzen wurden an einem Bruker AC-200 oder AM-400 Spektrometer im Institut für Organische Chemie, Technische Universität Braunschweig, aufgenommen.

NMR-Spektren von Reinsubstanzen wurden an einem Bruker DPX-300, ARX-400 oder DMX-600 Spektrometer in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, aufgenommen. Es wurden

1-dimensionale NMR-Experimente: ^1H , ^{13}C (BB und DEPT), ^1H , ^1H -NOESY und

2-dimensionale NMR-Experimente: ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^{13}C -HMQC,¹⁴⁹ ^1H , ^{13}C -HMBC,¹⁵⁰
 ^1H , ^1H -ROESY^{151,152}

durchgeführt. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben.

Die Spektren der Reinsubstanzen wurden mit 1D-WIN-NMR- oder 2D-WIN-NMR-Software (1D: Version 6.0 bzw. 2D: Version 6.02, Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) bearbeitet. Zur Kalibrierung wurden Lösungsmittel-Signale (^{13}C : CDCl_3 77,0 ppm, CD_3OD 49,0 ppm) und Signale der nicht perdeutierten Lösungsmittel (^1H : CHCl_3 in CDCl_3 7,26 ppm, CH_3OD in CD_3OD 3,35 ppm) verwendet.

2.6.2 Massenspektrometrie

MS-Messungen wurden an einem Finnigan MAT 8430 Spektrometer durchgeführt (EI: 70 eV; CI: NH_3 ; FAB: Xe). Der Cembranmethylester wurde an einem Finnigan MAT 95 Spektrometer in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, MS analysiert (EI: 70 eV). Für die Matrix-unterstützte-Laserdesorption/ionisierung/Flugzeit-Massenspektrometrie wurde ein Reflex^R MALDI/TOF-Massenspektrometer (Bruker-Franzen-Analytik, Bremen) verwendet. Beschleunigungsspannung +28kV im linearen Modus, Matrixsubstanz: Sinapinsäure, Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$), Scout-Multiprobe-Ionenquelle.

2.6.3 UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit einem Shimadzu UV-200S Zweistrahlphotometer und einem Kipp & Zonen BD-40 Schreiber mit 1,000 cm Quarzküvetten aufgenommen.

2.6.4 IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden an einem ATI Mattson Genesis Series FT-IR aufgenommen. Alle Proben wurden im Film auf einem NaCl-Fenster gemessen.

2.6.5 GC-MS-Analysen

GC-MS-Analysen wurden an einem Carlo-Erba HRGC 5160 gekoppelt an ein Finnigan MAT 4515 Spektrometer (40eV) durchgeführt. Als stationäre Phase wurde eine DB1-30W Kapillarsäule (30 m × 0,32 mm i.D., 0,25µm Methylsilikon) verwendet. Injektortemperatur = 250°C, Splitverhältnis 1:20, Trägergas: Helium (0,75 bar), lineares Temperaturprogramm (6°C/Minute) von 150 bis 300°C. Die Methylierung von Proben erfolgte in *tert*-Butylmethylether-Lösung durch Zugabe von Trimethylsulfoniumhydroxid.

2.6.6 Polarimetrie

Die optische Drehung wurde an einem Perkin Elmer 241 Polarimeter mit einer 1 ml Messzelle (Länge 10,000 cm) gemessen und die spezifische Drehung nach der Formel

$$[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = \frac{\alpha}{l \times c}$$

mit α = Drehwinkel, l = Länge der Messzelle und c = Konzentration der Lösung [g/ml] berechnet.

2.6.7 Schmelzpunkt

Schmelzpunkte wurden auf einem Wepa-Schmelzpunktblock gemessen und sind nicht korrigiert.

2.7 Statistische Berechnungen

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte mit Microsoft Excel (Version 7.0/95). Die Standardabweichung STABWN der Restenzymaktivitäten von AZT-Triphosphat 0,5 nM und Foscarnet 10 μ M wurde ausgehend von der Grundgesamtheit nach folgender Formel berechnet:

$$STABWN = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

mit x = messbare Zufallsvariable und n = Anzahl der Variablen der Grundgesamtheit.

2.8 Derivatisierungsreaktion

2.8.1 Reduktion von Dictyodial

Zu einer Lösung von 6 mg LiAlH_4 in 1 ml absolutem Diethylether wurden unter Eiskühlung 90 mg Dictyodial (**10**) in 1 ml absolutem Diethylether langsam unter Rühren zuge tropft und bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Reduktion des Dictyodials weiter gerührt. Durch DC auf Kieselgel (EtOAc/Hexan 30/70) wurde der Verlauf der Reaktion verfolgt. Die Reaktion wurde nach 8 h durch Zugabe von 1-2 ml H_2SO_4 10% gestoppt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die wässrige Phase wurde mit 3×5 ml Diethylether ausgeschüttelt, über 1 g Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Die Reinigung durch Normalphasen-HPLC (EtOAc/Hexan 37/63) ergab 30 mg Dictyodiol (**18**).

2.9 Chemikalien

Lieferanten der nachfolgenden Chemikalien waren:

Aldrich:	Dodecylpyridiniumchlorid \times H ₂ O, Hydroxypropylpyridin, Hydroxypyridinethobromid, Nicotinsäurehexylester
Chemotrade:	Chloroform-d, 99,87% D
Difco:	Marine Broth
Fluka:	Agar, Benzylpenicillin, Hefeextrakt, Nicotin, Streptomycinsulfat, (R)-Mellein
ICB:	Methanol-d ₄ , 99,8% D (0844-25)
Merck:	EtOH Uvasol 980 ^R für die UV-Spektroskopie
Merck Sharp & Dome:	Dimethylsulfoxid-d ₆ , 99,5% D (MD-1313)
Millipore:	milli-Q ^R Anlage für demineralisiertes H ₂ O
Sigma:	Adenosintriphosphat Dinatriumsalz, Dithiothreitol, Phosphonoameisensäure Trinatriumsalz \times 6 H ₂ O, NaF, Na ₃ VO ₄ , Trigonellin
Upstate Biotechnology:	p56 ^{lck} -Tyrosin-Kinase
Villa Natura, Kirn:	Biomalz

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck oder Boehringer Mannheim, alle nicht genannten Lösungsmittel von Merck oder Roth in den Qualitäten p. A. oder reinst bezogen. Sämtliche Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. AZT-Triphosphat wurde von Dr. T. Emrich, Boehringer Mannheim, Penzberg, zur Verfügung gestellt.

2.10 Beteiligte Personen und Institute

Makroorganismen: *Sammlung:* I. Fehrs, J. Scholz, Biologische Bundesanstalt Helgoland; A. Koulman, Niederlande; U. Karsten, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven; G. M. König, A. D. Wright, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig. *Taxonomie:* I. Price, James Cook University, Townsville, Australien; P. Alderslade, Museum and Art Galleries of the Northern Territory, Darwin, Australien; R. Desqueyroux-Faundez, Musée d'Histoire Naturelle, Genf, Schweiz. *Extraktion (Screening):* C. Dreikorn, L. Peters, I. Rahaus, M. Wessels, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig.

Cyanobakterien: *Sammlung:* U. Höller, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig; A. Oberemm, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und

Veterinärmedizin (BgVV), Berlin; O. Papendorf, A. D. Wright, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig. *Taxonomie*: J. Rethmeier, Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie, Universität Bremen. *Reinigung, Kultivierung und Extraktion*: O. Papendorf, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig.

Pilze: *Ausgangsmaterial (Algen, Schwämme)*: U. Höller; G. M. König, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig; C. Schütt, Biologische Bundesanstalt Helgoland; C. Wegner, A. D. Wright, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig. *Taxonomie (Algen, Schwämme)*: D. Barthel, Institut für Meereskunde der Universität Kiel; I. Bartsch, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven; R. Desqueroux-Faundez, Musée d'Histoire Naturelle, Genf, Schweiz; A. Flores Moya, Facultad de Ciencias, Universidad de Malaga, Spanien

Pilzisolat: Isolierung, Kultivierung und Extraktion: U. Höller, C. Wegner, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig. *Taxonomie*: S. Dräger, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig; R. A. Samson, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Barn, Niederlande.

Bakterien: *Isolierung und Kultivierung*: R. Pukall, G. Ulrichs, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig. *Extraktion*: G. Gramlich, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig.

Samenpflanzen: *Sammlung, Extraktion*: H. A. Ali (Sudan), J. Tschibangu (Zaire), Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig. *Taxonomie*: Prof. G. Troubain, Universität Lüttich, Belgien (Zaire); A. Hussain, Department of Botany, Faculty of Science, Nillien University, Khartoum, Sudan.

HIV-1-RT- und p56^{lck}-Tyrosin-Kinase-Tests: C. Dreikorn, N. Fusch, I. Rahaus, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig.

Bioassay: C. Dreikorn, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig.

Zytotoxizitätstest: A. Dotzauer, Universität Bremen; N. Lang-Unnasch, Division of Geographic Medicine, University of Alabama at Birmingham, U.S.A.

Antivirale Tests: A. Dotzauer, Universität Bremen.

Antiplasmodiale Test: E. Gobright, R. Kaminsky, Schweizer Tropeninstitut, Basel; N. Lang-Unnasch, Division of Geographic Medicine, University of Alabama at Birmingham, U.S.A.

Trypanosomentests: E. Gobright, R. Kaminsky, Schweizer Tropeninstitut, Basel.

NMR: P. Holba-Schulz, I. Rübesamen, NMR-Labor der Chemischen Institute, Technische Universität, Braunschweig; B. Jaschok-Kentner, C. Kakoschke, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig.

MS: D. Döring, U. Papke, H.-M. Schiebel, Institut für Organische Chemie, Technische Universität, Braunschweig; R. Christ, A. Waßmann, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig.

IR: T. Kroker, P. Reich, Institut für Pharmazeutische Chemie, Technische Universität, Braunschweig.

3 Ergebnisse

3.1 Screening von Extrakten und Reinsubstanzen

Naturstoffe haben sich als potente Inhibitoren der HIV-1-RT und auch der p56^{lck}-PTK erwiesen (siehe 1.2 und 1.3). Weitere und strukturell neue Hemmstoffe können durch die Untersuchung verschiedener Extrakte in Enzymtests und die anschließende Isolierung der aktiven Komponenten gefunden werden. In dieser Arbeit wurden vor allem Extrakte mariner Organismen bearbeitet. So wurde vom Artenreichtum tropischer mariner Riffe und von den chemisch vielfältigen Stoffwechselprodukten profitiert, die durch die Meeresbewohner erzeugt werden. Extrakte kamen für eine weitere Bearbeitung vorzugsweise dann in Betracht, wenn eine starke Hemmung von nur einem der beiden Enzyme festgestellt wurde. Damit konnte eine unspezifische Wechselwirkung mit Proteinen als Ursache für die Aktivität ausgeschlossen werden. Bereits isolierte Reinsubstanzen aus der Naturstoffsammlung der Arbeitsgruppe wurden ebenfalls untersucht, um deren Potenz als Inhibitoren gegenüber HIV-1-RT und p56^{lck}-PTK festzustellen.

Für die bei der biologischen Prüfung in Enzymtests eingesetzten Konzentrationen wurden folgende Annahmen gemacht: wie in der Einleitung gezeigt (siehe 1.2 und 1.3) liegen interessante Aktivitäten von Naturstoffen im μM -Bereich. Bei einem Sekundärstoffgehalt von 0,1% im Extrakt und einer mittleren Molmasse von 300 liegen diese Stoffe bei 66 μg Extrakt/ml Reaktionsgemisch in Konzentrationen von 0,2 μM (HIV-1-RT-Test) bzw. bei 200 μg Extrakt/ml Reaktionsgemisch von 0,6 μM (p56^{lck}-PTK-Test) vor. Daher sollte selbst niedrigeren Konzentrationen im Extrakt oder höheren M_r zumindest eine schwache Hemmung der Enzyme verursacht werden. Bei Reinsubstanzen wurden für das Screening die gleichen Konzentrationen eingehalten, was Konzentrationen von 200 bis 600 μM entspricht (ein Molekulargewicht von 300 angenommen). Eine genauere Charakterisierung der Hemmstoffaktivität erfolgte bei HIV-1-RT-Inhibitoren durch Verdünnungsreihen der Probelösungen (siehe 3.2).

Zur Kontrolle der Enzymhemmtests wurden mit jedem Testansatz bekannte Inhibitoren untersucht (Tabelle 6). Für den HIV-1-RT-Test wurden AZT-Triphosphat 0,5 nM oder Foscarnet 10 μM verwendet. Von AZT-Triphosphat 0,5 nM wurde eine einzige Stammlösung (1 mM) verwendet, die jeweils verdünnt verwendet und maximal 14 Tage bei -20° C gelagert wurde. Foscarnet 10 μM wurde ebenfalls aus einer Stammlösung (10 mM) hergestellt und war bei -20° C stabil. Die Stammlösung wurde bei Bedarf durch Lösen der Festsubstanz in 10% DMSO/Lysis-Puffer frisch hergestellt. In die Auswertung der Positivkontrollen AZT-Triphosphat 0,5 nM und Foscarnet 10 μM wurden nicht nur Stichproben, sondern sämtliche

Testergebnisse einbezogen. Durch Einbeziehung mehrerer unabhängig voneinander hergestellter Foscarnet-Stammlösungen wurde bei Foscarnet 10 µM eine höhere Standardabweichung als bei AZT-Triphosphat 0,5 nM (Tabelle 6) errechnet.

Tabelle 6: Positivkontrollen für HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Tests (siehe 2.4.1, 2.4.2)

Inhibitor	Mittelwert der Restenzymaktivität (%)	Grundgesamtheit/Stichprobe	Standardabweichung (%)	Prozentuale Standardabweichung
AZT-Triphosphat 0,5 nM	29,3	19	± 5,23	± 17,84%
Foscarnet 10 µM	16,9	96	± 8,46	± 50,16%
Piceatannol 3 mM	-2,0	42	n. b.	n. b.

n. b. = nicht bestimmt

Kontrollsubstanz im PTK-Test war Piceatannol mit einer Konzentration von 3 mM, die bedingt durch die Instabilität von Piceatannol in verdünnter Lösung eingesetzt werden musste und bei welcher die PTK vollständig gehemmt wurde. Der Mittelwert der Restenzymaktivitäten wurde von einer Stichprobe (n = 42) bestimmt, da auch Tests mit selbst hergestellten Lösungen der Substanz durchgeführt wurden (Tabelle 6). Die ausgewertete Stichprobe wurde durch Piceatannol-Lösungen aus dem Test-Kit von Boehringer Mannheim erhalten (siehe 2.4.2). Das Enzym wurde immer vollständig gehemmt. Insgesamt zeigt die Auswertung der Positivkontrollen, dass in den Enzymhemmtests Inhibitoren von HIV-1-RT und der PTK p56^{lck} sicher erkannt werden können.

Grenzwerte, die zum Ausschluss von Extrakten von weiteren Untersuchungen führten, wurden im Laufe des Screenings festgelegt. Da durch die Standardabweichungen der Restaktivitäten von HIV-1-RT bei AZT-Triphosphat und Foscarnet gezeigt werden konnte, dass eine Schwankung der Enzymrestaktivität von gerundet ± 10% durch das Testverfahren bedingt ist (Tabelle 6), sollten aktive Extrakte die Aktivität um mindestens das Doppelte, (20%) reduzieren können, was einem Grenzwert von 80% Restaktivität des Enzyms entspricht. Auf diese Weise konnten 88,3% der Extrakte durch den HIV-1-RT-Test von der weitergehenden Analyse ausgeschlossen werden. Im p56^{lck}-PTK-Test lagen die Extrakte in höherer Konzentration vor und die Anzahl der identifizierten Extrakte führte erst bei einem Grenzwert von 50% Enzymrestaktivität zum Ausschluss von 86,2% der Extrakte. Niedrigere Grenzwerte wurden nicht gewählt, damit auch Substanzen mit möglicherweise starker Aktivität aber geringer Konzentration im Extrakt noch detektiert werden konnten. Extrakte und Reinsubstanzen, welche die Enzyme weniger stark hemmten, wurden als inaktiv eingestuft.

Die Hemmung von nur einem der eingesetzten Enzyme mit mittlerer bis starker Potenz wurde bei 37 von 896 Extrakten, also bei 4%, beobachtet. Davon wurden acht Extrakte in dieser Arbeit untersucht.

3.1.1 Untersuchung von Extrakten

Bei der Auswertung der Testergebnisse wurde zwischen starker (0 - 20% Enzymrestaktivität), mittlerer (20 - 50%) und schwacher (50 - 80%) Aktivität der Extrakte im HIV-1-RT-Test (Tabelle 7), und zwischen starker (0 - 20%) und schwacher (20 - 50%) Aktivität im PTK-Test (Tabelle 8) unterschieden.

Tabelle 7: Aktivität der Extrakte im HIV-1-RT-Test (siehe 2.4.1)

Organismengruppe	Gesamtzahl ^a	Schwache Aktivität ^a	Mittlere Aktivität ^a	Starke Aktivität ^a
Algen	207	24 (11,6%)	3 (1,4%)	1 (0,5%)
Schwämme	171	15 (8,8%)	2 (1,2%)	3 (1,8%)
Sonstige marine Makroorganismen^b	136	13 (9,6%)	-	-
Cyanobakterien	139	4 (2,9%)	-	-
Pilzisolat	159	24 (15,1%)	2 (1,3%)	1 (0,6%)
Bakterienisolate	35	-	-	-
Spermatophyta	49	7 (14,3%)	-	6 (12,2%)
Summe	896	87 (9,7%)	7 (0,8%)	11 (1,2%)

^a Anzahl der Extrakte ≠ Anzahl der Organismen, da teilweise mehrere Extrakte aus einem Organismus erhalten wurden; Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Organismengruppe; ^b Bryozoa, Chordata, Cnidaria, Mollusca

Tabelle 8: Aktivität der Extrakte im PTK-Test (siehe 2.4.2)

Organismengruppe	Gesamtzahl ^a	Schwache Aktivität ^a	Starke Aktivität ^a
Algen	155	21 (13,5%)	10 (6,5%)
Schwämme	117	11 (9,4%)	15 (12,8%)
Sonstige marine Makroorganismen^b	88	2 (2,3%)	-
Cyanobakterien	133	2 (1,5%)	-
Pilzisolat	106	5 (4,7%)	10 (9,4%)
Bakterienisolate	35	1 (2,9%)	-
Spermatophyta	47	6 (12,8%)	11 (23,4%)
Summe	681	48 (7,0%)	46 (6,8%)

^a Anzahl der Extrakte ≠ Anzahl der Organismen, da teilweise mehrere Extrakte aus einem Organismus erhalten wurden; Prozentangaben beziehen sich auf die jeweilige Organismengruppe; ^b Bryozoa, Chordata, Cnidaria, Mollusca

Die Auswertung der Testergebnisse zeigte, welche Organismengruppen Hemmstoffe in hohen Konzentrationen oder mit starker Aktivität bilden können (Tabelle 7, Tabelle 8). Organismen, deren Extrakte starke oder mittlere Aktivität besaßen, werden im folgenden einzeln aufgeführt. Organismen, deren Extrakte die Enzymaktivität nur schwach hemmten, sind nur im Anhang gekennzeichnet

Die Mehrzahl der untersuchten marinen Makroorganismen waren Algen oder Schwämme. Ausschließlich bei diesen traten starke und mittelstarke Hemmungen der Enzyme auf (siehe unten). Von den 136 Extrakten der sonstigen marinen Makroorganismen, die im HIV-1-RT-Test untersucht wurden, sind 13 durch eine schwache Aktivität aufgefallen. Im PTK-Test wurden 88 Extrakte getestet, von denen 2 durch eine schwache Hemmung der $p56^{lck}$ auffielen. Eine Aufstellung dieser Organismen befindet sich im Anhang 6.1.1 a)-d).

Von insgesamt 207 Algenextrakten, die im HIV-1-RT-Test untersucht wurden, waren 28 aktiv. Davon hemmten 3 Extrakte HIV-1-RT mit mittlerer und 1 Extrakt das Enzym mit starker Potenz. Im PTK-Test wurden 155 Extrakte untersucht und 31 als aktiv identifiziert. Durch eine starke Hemmung von $p56^{lck}$ fielen 10 Extrakte auf (Tabelle 9, siehe Anhang 6.1.1 e)).

Von 171 im HIV-1-RT-Test untersuchten Extrakten aus Schwämmen waren insgesamt 20 aktiv. 2 dieser Extrakte fielen durch mittlere und 3 Extrakte durch starke Aktivität auf. Im PTK-Test wurden 117 Schwammextrakte getestet. Davon waren 26 aktiv. Eine große Anzahl von Organismen (13 von 14) mit starker $p56^{lck}$ -Hemmaktivität wurde gefunden, die bei Abschluss dieser Arbeit noch nicht taxonomisch identifiziert waren (Tabelle 10, siehe Anhang 6.1.1 f)).

Im HIV-1-RT-Test wurden 139 Cyanobakterienextrakte getestet. Bei 4 wurde eine schwache Hemmung des Enzyms festgestellt. $p56^{lck}$ -PTK-Tests wurden mit 133 Cyanobakterienextrakten durchgeführt, wobei 2 Extrakte durch schwache Aktivität auffielen. Kein Blaualgenextrakt war starker oder mittelstarker Inhibitor der Enzyme (siehe Anhang 6.1.2).

Von 159 im HIV-1-RT-Test untersuchten Pilzextrakten wiesen 27 Hemmaktivität auf. Es waren davon 24 Extrakte nur schwach, 2 mittel und ein Extrakt stark aktiv. 106 Extrakte wurden auf ihre Aktivität gegen $p56^{lck}$ -PTK untersucht. Hier zeigten 5 schwache Hemmung des Enzyms, 10 waren stark aktiv (Tabelle 11, siehe Anhang 6.1.3).

Im HIV-1-RT- und $p56^{lck}$ -PTK-Test wurden 35 Bakterienextrakte getestet. Ein CH_2Cl_2 -Extrakt von *Sulfitobacter pontiacus* fiel durch schwache Aktivität im $p56^{lck}$ -PTK-Test auf. Kein Bakterienextrakt war starker oder mittelstarker Inhibitor der Enzyme.

Tabelle 9: Algenextrakte mit RT- oder PTK-Hemmaktivität^a

Alge (Extraktionsmittel) ^b	RT-Aktivität ^c	PTK-Aktivität ^d
<i>Ascoseira mirabilis</i> (M)	n. a.	0
<i>Caulerpa prolifera</i> (D)	75	13
<i>Desmarestia menziesii</i> (M)	n. a.	1
<i>Dictyota volubilis</i> (D)	27	n. a.
<i>Enteromorpha</i> sp. (M)	n. a.	8
<i>Enteromorpha</i> sp. (D)	1	n. a.
<i>Enteromorpha compressa</i> (D)	n. a.	12
<i>Gymnogongrus antarcticus</i> (M)	75^e	19
<i>Himanthothallus grandifolius</i> (M)	n. a.	0
<i>Kallymenia antarctica</i> (M)	n. a.	6
<i>Laminaria saccharina</i> (D)	n. a.	5
<i>Udotea</i> sp. (D)	46	n. a.
Grünalge CT195 I (D)	31	n. a.
Grünalge 199a (M)	n. a.	2

^a Angabe der Enzymrestaktivität in %, Extrakterstellung: siehe 2.1.1, n. a. = nicht aktiv; ^b durch Fettdruck hervorgehobene Arten wurden näher untersucht (siehe 3.2), Extraktionsmittel: M = MeOH, D = CH₂Cl₂, Herkunft: siehe 6.1.1 e); ^c Extraktkonzentration: 66 µg/ml (siehe 2.4.1); ^d Extraktkonzentration: 200 µg/ml (siehe 2.4.2); ^e Mittelwert (n = 3)

Tabelle 10: Schwammextrakte mit RT- oder PTK-Hemmaktivität^a

Schwamm (Extraktionsmittel) ^b	RT-Aktivität ^c	PTK-Aktivität ^d
<i>Amphimedon</i> sp. (M)	1	n. a.
<i>Laxosuberitis rugosa</i> (D)	38	n. a.
<i>Hyrtios</i> cf. <i>erecta</i> (D/M)	25^e/n. a.	n. a./ 10
<i>Xestospongia rosariensis</i> (D/M)	4/1	n. a.
CT 198 FFF (M)	n. a.	12
CT 198 GG (D)	n. a.	8
CT 198 HH (D)	n. a.	1
CT 198 I (M)	n. a.	3
CT 198 KKK (D)	n. a.	9
CT 198 L (D)	n. a.	15
CT 198 MeK (D)	n. a.	11
CT 198 MMM (D)	n. a.	19
CT 198 NNN (M)	n. a.	1
CT 198 OOO (D)	n. a.	14
CT 198 XXX (D)	n. a.	13
CT 902 JJ (M)	n. a.	15
LL 20 (M)	n. a.	3

^a Angabe der Enzymrestaktivität in %, Extrakterstellung: siehe 2.1.1, n. a. = nicht aktiv; ^b durch Fettdruck hervorgehobene Arten wurden näher untersucht (siehe 3.2), Extraktionsmittel: M = MeOH, D = CH₂Cl₂, Herkunft: siehe 6.1.1 f); ^c Extraktkonzentration: 66 µg/ml (siehe 2.4.1); ^d Extraktkonzentration: 200 µg/ml (siehe 2.4.2); ^e Mittelwert (n = 3)

Tabelle 11: Pilzisolat mit RT- oder PTK-Hemmaktivität ^a

Pilzisolat ^b	Medium ^c	RT-Aktivität ^d	PTK-Aktivität ^e
193 A 26	Bfl	n. a.	14
193 I 36	B	36	n. b.
<i>Dendriphiella salina</i>	B	n. a.	15
<i>Drechslera</i> sp.	MS	n. a.	18
<i>Epicoccum</i> sp.	Bfl/MS/B	n. a.	10/6/23
N 7-8	Bfl/MS/B	n. a.	9/2/3
S 2-3	MS	n. a.	2
<i>Ulocladium botrytis</i>	B	7^f	3^f

^a Angabe der Enzymrestaktivität in %, Extraktherstellung: siehe 2.1.3, n. a. = nicht aktiv; n. b. = nicht bestimmt; ^b durch Fettdruck hervorgehobene Arten wurden näher untersucht (siehe 3.2); ^c Zusammensetzung der Medien: siehe 2.1.3.2; ^d Extraktkonzentration: 66 µg/ml (siehe 2.4.1); ^e Extraktkonzentration: 200 µg/ml (siehe 2.4.2); ^f Kultivierung: Februar 1997

Tabelle 12: Extrakte von Spermatophyta mit RT- oder PTK-Hemmaktivität ^a

Artbezeichnung (Extraktionsmittel) ^b	RT-Aktivität ^c	PTK-Aktivität ^d
<i>Acanthospermum hispidum</i> (MH)	n. a.	-1
<i>Catha edulis</i> (MH)	73	13
<i>Combretum hartmanianum</i> (MH)	5/17/0^e	0/0/-1^f
<i>Croton zambiscus</i> (MH)	79	0
<i>Gardenia lutea</i> (MH)	n. a.	6^g
<i>Rubus rigidus</i> (M)	0	-5
<i>Tamarix nilotica</i> (MH)	n. a.	0/-1^h
<i>Ziziphus spira christi</i> (MH)	78ⁱ	1/9^k

^a Angabe der Enzymrestaktivität in %, Extraktherstellung: siehe 2.1.5, n. a. = nicht aktiv; ^b Extraktionsmittel: M = MeOH, MH = MeOH/H₂O (80/20, V/V), Herkunft: siehe 6.1.4; ^c Extraktkonzentration: 66 µg/ml (siehe 2.4.1); ^d Extraktkonzentration: 200 µg/ml (siehe 2.4.2); ^e Stamm (Mittelwert, n=2) / Rinde (Mittelwert, n=2) / Blätter; ^f Stamm / Rinde / Blätter; ^g Blätter; ^h Stamm / Gallen; ⁱ Früchte; ^k Blätter / Früchte

Insgesamt 13 von 49 Extrakten aus Samenpflanzen waren im HIV-1-RT-Test aktiv. Dabei wurde das Enzym von 6 Extrakten stark gehemmt. PTK-Hemmung wurde bei 17 von 47 getesteten Extrakten aus Spermatophyta festgestellt. p56^{lck} wurde von 11 Extrakten stark und von 6 Extrakten schwach gehemmt. Im Vergleich zu allen anderen untersuchten Organismengruppen wurden bei den Spermatophyta in beiden Tests hohe Trefferraten festgestellt. Hierbei muss beachtet werden, dass von einigen Pflanzen jeweils mehrere Extrakte aus verschiedenen Organen untersucht wurden (Tabelle 12, siehe Anhang 6.1.4).

3.1.2 Untersuchung von Reinsubstanzen

Die für die Aktivität von Extrakten (siehe 3.1.1) festgelegten Grenzwerte wurden bei Reinstoffen unverändert angewendet. Demgemäß wurden Verbindungen im HIV-1-RT-Test als stark (0 – 20% Enzymrestaktivität), mittel (20 – 50%) oder schwach (50 – 80%), und im PTK-Test als stark (0 – 20%) oder schwach aktiv (20 – 50%) eingestuft. 11 von 140 getesteten Substanzen wurden als HIV-1-RT- und 22 von 135 als p56^{lck}-PTK-Inhibitoren identifiziert (Herkunft der untersuchten Reinsubstanzen: siehe 2.2). Naturstoffe, die sich nach den oben genannten Kriterien durch eine schwache Aktivität auszeichneten, sind nur in Tabelle 13 aufgeführt und werden nicht weiter diskutiert. In den Abschnitten 3.1.2.1 (HIV-1-RT) und 3.1.2.2 (p56^{lck}) werden die Strukturformeln der Inhibitoren angegeben. Reinsubstanzen, die HIV-1-RT stark hemmten, werden in den jeweiligen Abschnitten dieser Arbeit im Detail chemisch und biologisch charakterisiert. Die als Hemmstoffe der p56^{lck}-PTK identifizierten Substanzen aus der Arbeitsgruppe G. König, TU Braunschweig, werden in der Literatur (siehe Tabelle 13) bezüglich ihrer weiteren biologischen und chemischen Aspekte erschöpfend behandelt.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Aktivitäten von Reinsubstanzen im HIV-1-RT- und PTK-Test^a

Herkunft ^b	Bezeichnung der Verbindung	RT-Aktivität ^c	PTK-Aktivität ^d	Ref.
Weichtiere/Manteltiere				
<i>Aplysia dactylomela</i>	Furocaespitane (CT 195 A2 2.17.4.4)	74	n. a.	153
<i>Didemnum sp.</i>	LL48.12.3.3.9	n. a.	35	118
	LL48.12.3.6.9	n. a.	14	
Algen				
<i>Delisea sp.</i>	Delisea 17	n. a.	3 ^e	120
	Delisea 19	n. a.	3	
	Delisea 20	n. a.	6	
	Delisea 22	n. a.	2	
	Delisea 23	79	4	
	Delisea 25	71	n. a.	
	Delisea 13	n. a.	23	
	Delisea 16	n. a.	2	
<i>Dictyota pardalis</i>	MI 871 G.1	77	n. a.	154
<i>Dictyota volubilis</i>	Dictyodial (10)	16 ^f	11	121
<i>Plocamium costatum</i>	1,4-Dibrom-2,3,6-trichlor-3,7-dimethyl-7-octen (RDPLO 1.1.3.2.4)	34	n. b.	155
<i>Styopodium zonale</i>	Atomaric Acid ^g	n. a.	0 ^e	127
	Stypoquinonic Acid ^g	n. a.	0 ^e	
Schwämme				
<i>Cymbastela hooperii</i>	7-Isocyano-11(20),14-epi-amphilectane (CT 293 V8)	62	n. a.	156
<i>Iotrochota birotulata</i>	Arachidonsäure	n. a.	1	^h
<i>Hyrtios cf. erecta</i>	Fascaplysin (5)	0 ⁱ	10 ⁱ	86
	Homofascaplysin A (4)	n. a.	8 ^e	
	Isodehydroluffarielolid (3)	n. a.	50 ^e	
<i>Xestospongia rosariensis</i>	Halitoxin (6)	0 ⁱ	n. a.	157
Pilze				
<i>Ascochyta salicorniae</i>	Ascosalipyrrolone A (N 4-2.4.6 C)	n. a.	26	135
	2,3-Dihydro-2-hydroxy-2,4-dimethyl-5-trans-propenylfuran-3-on (N 4-2.8.3.3)	n. a.	10	
	Genistein (N 4-2.8.3.4)	n. a.	8	
<i>Drechslera dermatioidea</i>	Cochlioquinone B	70	0	158
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	(R)-Mellein	36 ^e /32 ^k	n. a.	136
<i>Ulocladium botrytis</i>	Clonostachydiol (20)	65	n. a.	138
	Ulocladol (19)	n. a.	6 ⁱ	137

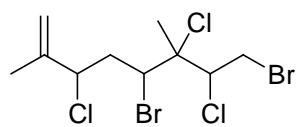
^a Angabe der Enzymrestaktivität in %, n. a. = nicht aktiv, n. b. = nicht bestimmt; ^b durch Fettdruck hervorgehobene Arten wurden in dieser Arbeit im Detail untersucht (siehe 3.2); ^c Konzentration: 66 µg/ml (siehe 2.4.1); ^d Konzentration: 200 µg/ml (siehe 2.4.2); ^e Mittelwert (n = 2); ^f Konzentration: 133 µg/ml (440 µM); ^g Atomaric Acid: IC₅₀ 208 µM; Styopoquinonic Acid: IC₅₀ 187 µM; ^h Herkunft von *Iotrochota birotulata*: siehe Anhang 6.1.1 f); ⁱ Mittelwert (n = 3); ^k Bestimmung mit Referenzsubstanz: (R)-Mellein (Fa. Fluka), Mittelwert (n = 2); ^l Konzentration: 20 µg/ml (63 µM)

3.1.2.1 Reinsubstanzen mit HIV-1-RT-Hemmaktivität

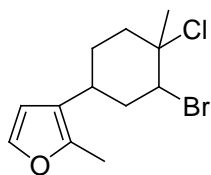
Von 140 getesteten Naturstoffen wurden 5 als mittlere bis starke HIV-1-RT-Inhibitoren identifiziert. 1,4-Dibrom-2,3,6-trichlor-3,7-dimethyl-7-octen aus *Plocamium costatum* und (R)-Mellein aus *Microsphaeropsis* sp. hemmten HIV-1-RT mit mittlerer Aktivität. Dictyodial (**10**) aus *Dictyota volubilis* (siehe 3.2.4), Fascaplysin (**5**) aus *Hyrtios* cf. *erecta* (siehe 3.2.1) und Halitoxin (**6**) aus *Xestospongia rosariensis* (siehe 3.2.2) waren starke HIV-1-RT-Hemmstoffe, die im Rahmen dieser Arbeit isoliert und charakterisiert wurden (Abbildung 1, Tabelle 13).

3.1.2.2 Reinsubstanzen mit p56^{lck}-PTK-Hemmaktivität

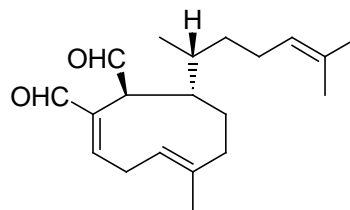
Eine starke Hemmung der PTK-Aktivität zeigten 17 der untersuchten 135 Naturstoffe. Diese im Vergleich zum HIV-1-RT-Test größere Trefferrate kann zumindest zum Teil durch die höhere Konzentration der Substanzen (200 µg/ml) begründet werden. Deshalb wurden auch Substanzen als Inhibitoren erkannt, die im Vergleich mit bekannten p56^{lck}-Hemmstoffen (siehe 1.3.1) nur schwach potent sind. Als Inhibitoren mit starker Aktivität identifiziert wurden eine Verbindung (LL48.12.3.6.9) aus *Didemnum* sp., eine Reihe halogenierter Furanone aus *Delisea* sp., Atomaric Acid und Styloquinonic Acid aus *Stylopodium zonale*, der HIV-1-RT Inhibitor Dictyodial (**10**) aus *Dictyota volubilis* (siehe Abbildung 1), Arachidonsäure aus *Lotrochota birotulata*, Homofascaplysin A (**4**) und das auch als HIV-1-RT-Hemmstoff identifizierte Fascaplysin (**5**) (siehe Abbildung 1) aus *Hyrtios* cf. *erecta* (siehe 3.2.1), Cochlioquinone B, ein aus *Drechslera dermatioidea* isoliertes Phytotoxin, Verbindung N 4-2.4.6 C, deren Struktur aus patentrechtlichen Gründen nicht angegeben werden kann, Genistein und 2,3-Dihydro-2-hydroxy-2,4-dimethyl-5-trans-propenylfuran-3-on aus *Ascochyta salicorniae* sowie Ulocladol (**19**) aus *Ulocladium botrytis* (Abbildung 2, Tabelle 13).



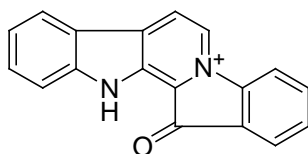
1,4-Dibrom-2,3,6-trichlor-
3,7-dimethyl-7-octen



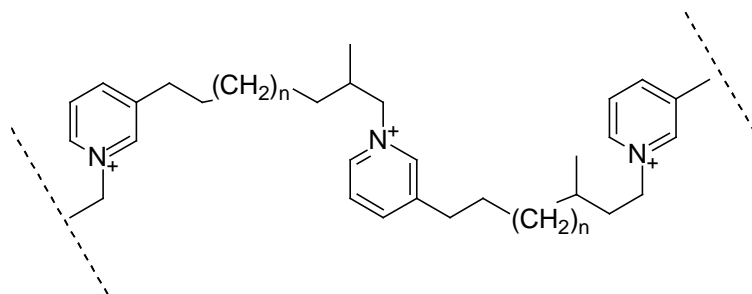
Furocaespitane



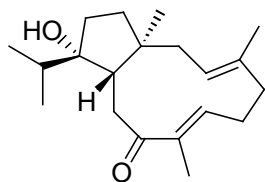
Dictyodial (10)



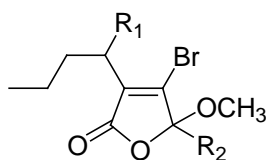
Fascaplysin (5)



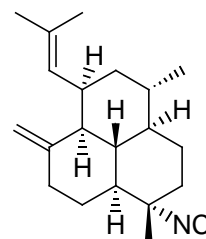
Halitoxin (6)
 $n = 4$, M_r 5190



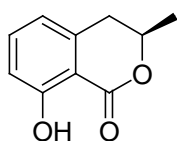
Verbindung MI 871 G.1



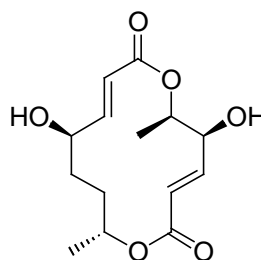
delisea 13 $R_1 = \text{OAc}$ $R_2 = \text{CHBr}_2$
delisea 25 $R_1 = \text{OH}$ $R_2 = \text{CH}_2\text{I}$



7-Isocyano-11(20),14-
epiamphilectadiene

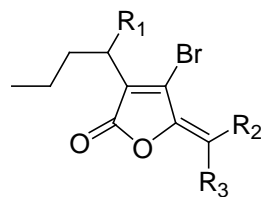


(R)-Mellein

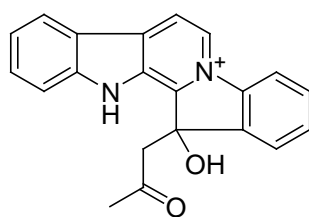


Clonostachdiol (20)

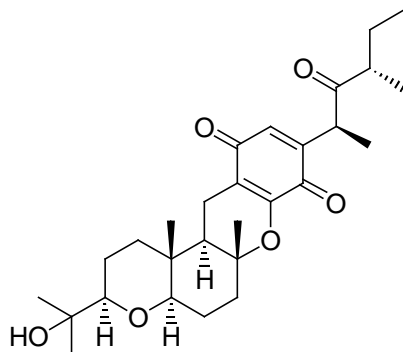
Abbildung 1: Strukturformeln der HIV-1-RT-Hemmstoffe

Furanone aus *Delisea* sp.

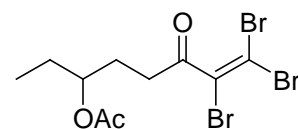
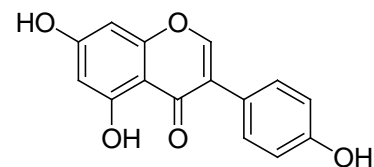
Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
<i>Delisea</i> 16	OAc	Br	Br
<i>Delisea</i> 17	OH	Br	Br
<i>Delisea</i> 19	OH	H	Br
<i>Delisea</i> 20	OH	I	H
<i>Delisea</i> 22	OH	H	Cl
<i>Delisea</i> 23	OH	H	I



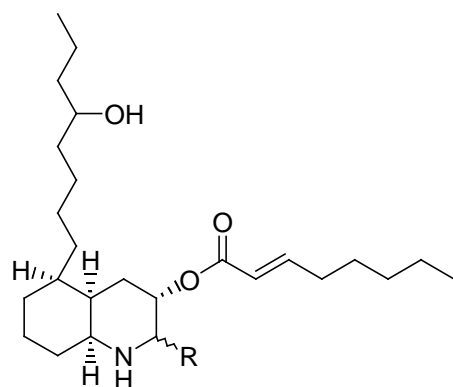
Homofascaplysin A (4)



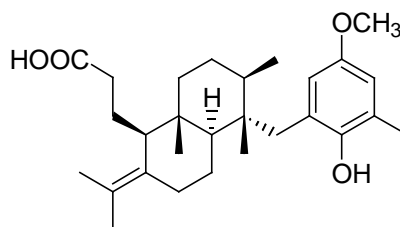
Cochlioquinone B

*Delisea* 7

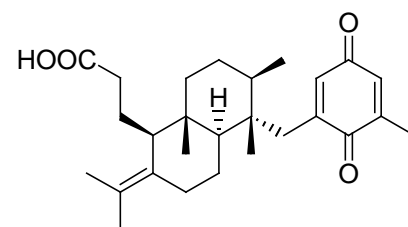
Genistein



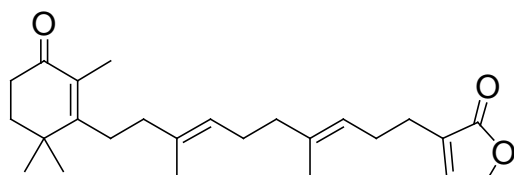
Verbindung LL48.12.3.6.9 R = ---CH_3
 Verbindung LL48.12.3.3.9 R = ---CH_3



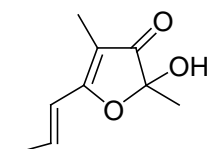
Atomaric Acid



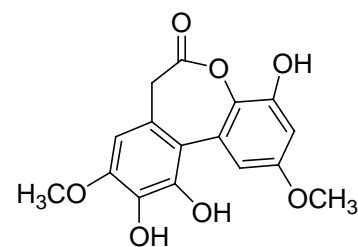
Styptoquinonic Acid



Isodehydroluffariellolid (3)



2,3-Dihydro-2-hydroxy-
 -2,4-dimethyl-5-trans-
 propenyfuran-3-on



Ulocladol (19)

Abbildung 2: Strukturformeln der p56^{lck}-PTK-Hemmstoffe

3.2 Charakterisierung der untersuchten Organismen

Acht in den Enzymhemmtests (siehe 3.1.1) aktive Proben wurden ausgewählt, in größerem Maßstab extrahiert (siehe 2.3.1, 2.3.2) und ausführlich untersucht. Dabei wurden auch die HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Tests wiederholt. Die Enzymhemmungen wurden bei *Hyrtios cf. erecta*, *Xestospongia rosariensis*, *Amphimedon* sp., *Ulocladium botrytis* und *Epicoccum* sp. wiedergefunden (Tabelle 14). Die *Dictyota-volubilis*- und *Gymnogongrus-antarcticus*-Extrakte wurden fraktioniert bevor die Tests durchgeführt werden konnten, so dass kein Rohextrakt für die nochmalige biologische Prüfung verblieb. *Lobophytum crassum* wurde zur Analyse der Sekundärmetaboliten ausgewählt, da aus Weichkorallen schon eine Vielzahl interessanter und biologisch aktiver Metabolite isoliert wurden; die Weichkorallenextrakte hemmten jedoch keines der beiden Enzyme.

Tabelle 14: HIV-1-RT- und PTK-Tests ausgewählter Tiere und Pilze^a

Organismus ^b	RT-Hemmung ^c	PTK-Hemmung ^d
<i>Hyrtios cf. erecta</i> (D/M)	15/n. a.	n. a./10
<i>Xestospongia rosariensis</i> (M)	0	n. a.
<i>Amphimedon</i> sp. (M)	4	n. a.
<i>Ulocladium botrytis</i> (B)	54 ^e	20 ^e
<i>Epicoccum</i> sp. (Bfl)	n. a.	6 ^f

^a Angabe der Enzymrestaktivität in %, Extraktherstellung (siehe 2.3.1, 2.3.2), n. a. = nicht aktiv; ^b Extraktionsmittel: M = MeOH, D = CH₂Cl₂, Kulturmedien B, Bfl: Zusammensetzung siehe 2.1.3.2; ^c Extraktkonzentration: 66 µg/ml (siehe 2.4.1); ^d Extraktkonzentration: 200 µg/ml (siehe 2.4.2); ^e Kultivierung Oktober 1997; ^f Mittelwert (n = 2)

In den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.6 dieser Arbeit werden die Untersuchungen der oben genannten Organismen mit Ausnahme der Rotalge *Gymnogongrus antarcticus* detailliert dargestellt. Die Bearbeitung des im Screening als aktiv gefundenen CH₂Cl₂-Extraktes von *Gymnogongrus antarcticus* (siehe 3.1.1) wird daher hier zusammengefasst.

Die VLC-Fraktionierung des CH₂Cl₂-Extraktes ergab 12 Fraktionen in Mengen von wenigen Milligramm. Im HIV-1-RT-Test hemmten alle diese Fraktionen das Enzym mittel bis schwach (44 – 59% Enzymrestaktivität). ¹H-NMR-Spektroskopie und RP-HPLC zeigten in den Fraktionen 5-7 eine Vielzahl strukturell ähnlicher Verbindungen, die auf Grund der sehr geringen Probenmenge (25 mg) nicht gereinigt werden konnten (Abbildung 3).

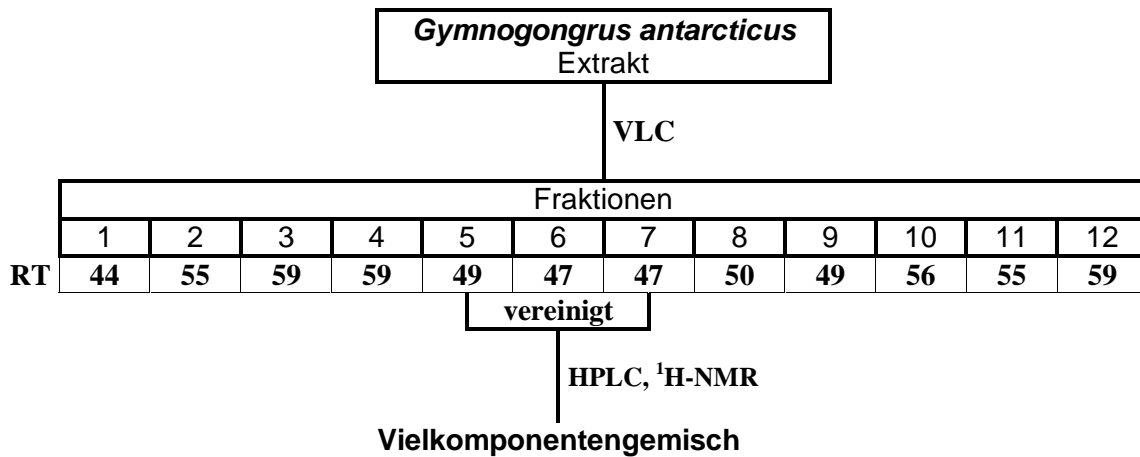


Abbildung 3: Fraktionierungsschema des Extraktes von *Gymnogongrus antarcticus*
RT = Angabe der Restenzymaktivität in %, siehe 2.4.1

In Agar-Diffusions-Tests wurden weitere biologische Aktivitäten des CH₂Cl₂-Extraktes von *Gymnogongrus antarcticus* gefunden. Der Extrakt besaß antifungale Wirkungen gegenüber *U. violacea* (50 µg / 2-6 mm TH/WH durch 3 Proben des Extraktes) und *E. repens* (50 µg / 4-5 mm WH) und antialgale Wirkung bei *C. fusca* (50µg / 2 mm WH).

Von *G. antarcticus* standen 20 g Biotrockenmasse zur Verfügung, die 300 mg CH₂Cl₂-Extrakt ergaben. Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnte kein zusätzliches Material der aus der Antarktis stammenden Alge erhalten werden, so dass eine Charakterisierung der Inhaltsstoffe hier nicht erfolgte.

3.2.1 *Hyrtios* cf. *erecta*

Schwämme sind die ergiebigste und damit wichtigste Quelle für biomedizinisch relevante marine Sekundärstoffe.¹⁵⁹ Vielfach handelt es sich hierbei um Alkaloide oder Terpene. Das anti-inflammatorisch wirksame Sesterterpen Manoalid wird z. B. für die Untersuchung von entzündlichen Prozessen genutzt.^{160,161} Aus der Gattung *Hyrtios* (Familie: Thorectidae) wurde eine Vielzahl von Sekundärstoffen beschrieben, wie z. B. Hyrtiomanzamin aus *H. erecta*, ein immunosuppressiv wirkendes β -Carbolin-Alkaloid.¹⁶² Aus *H. erectus* wurden zytotoxisch wirkende Sesterterpene mit einem bis dahin unbekannten Kohlenstoffgerüst (Hyrtiosan) wie auch solche mit Scalarangrundstruktur beschrieben.^{163,164} Altohyrtine A-C, Makrolide mit zytotoxischer Wirkung in Zellkulturen, wurden aus *H. altum* isoliert.^{165,166}

Im Verlauf dieser Arbeit fielen die Extrakte eines *Hyrtios* cf. *erecta* Keller 1889 durch ihre biologischen Aktivitäten in Enzymhemmtests auf (siehe 3.1.1). Zwei bisher nicht beschriebene Sesterterpene (**1**, **2**), sowie die strukturell bekannten Verbindungen Isodehydroluffariellolid (**3**)⁸⁶, Homofascaplysin A (**4**)⁸⁶ und Fascaplysin (**5**)¹⁶⁷ wurden isoliert. Isodehydroluffariellolid (**3**) im Gemisch mit den β -Carbolin-Alkaloiden Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) wurde zuvor aus der Gattung *Fascaplysinopsis* (Familie: Thorectidae) isoliert.^{86,167}

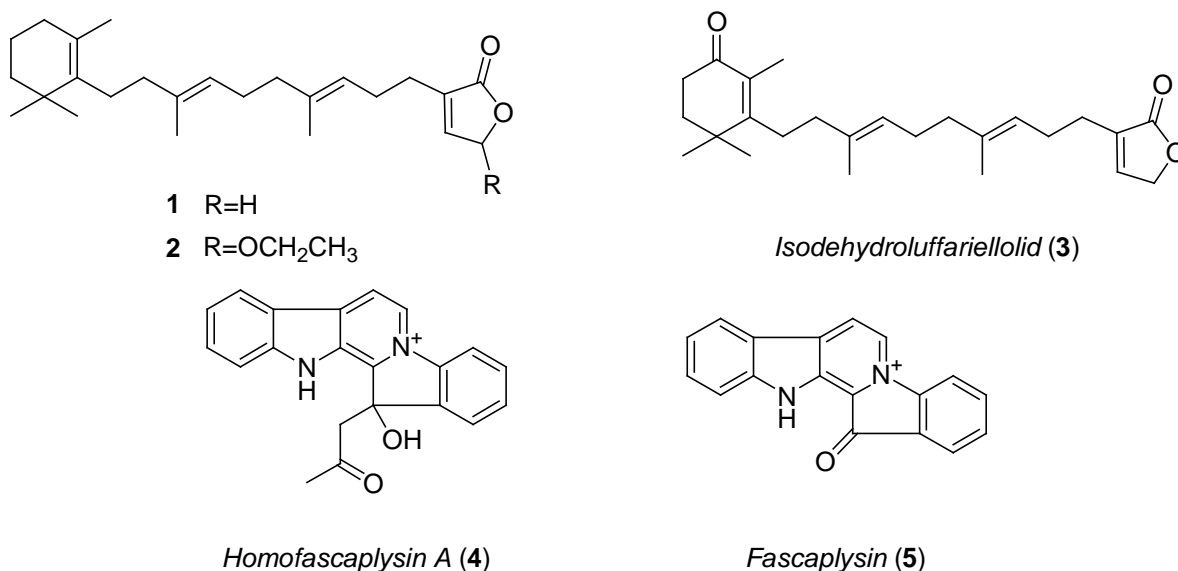


Abbildung 4: Strukturformeln der aus *Hyrtios* cf. *erecta* isolierten Verbindungen

Der CH₂Cl₂-Extrakt des Schwammes wurde durch VLC fraktioniert. Die HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Hemmung der Fraktionen wurde bestimmt. ¹H-NMR-Spektroskopie wies terpenoide Sekundärstoffe in vier Fraktionen nach. Diese wurden durch präparative HPLC an Kieselgel gereinigt und zwei unbekannte Sesterterpene (**1**, **2**) und Isodehydroluffariellolid (**3**)

isoliert. Die Enzymhemmtests zeigten in einer Fraktion aktive Naturstoffe an. Die anschließende Reinigung durch RP-HPLC führte zur Isolierung der Alkaloide Homofascaplysin A (**4**), ein p56^{lck}-PTKI, und des bereits als HIV-1-RT-Hemmstoff bekannten Fascaplysin (**5**), das ebenfalls die p56^{lck}-PTK hemmte (Details der Isolierung: siehe 2.3.1). Bei beiden Alkaloiden wurde in vitro eine potente Wachstumshemmung von *Plasmodium falciparum* festgestellt (siehe 3.2.1.1).

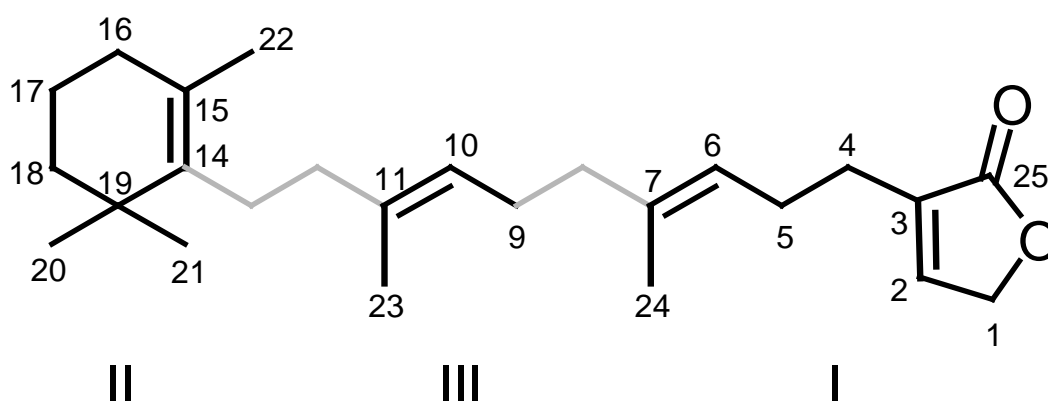


Abbildung 5: Aus NMR-Daten abgeleitete Substrukturen I, II, III von Verbindung **1**

Die Summenformel von **1**, C₂₅H₃₈O₂, wurde massenspektrometrisch ermittelt. Für ein α,β -ungesättigtes Lakton wurden charakteristische Absorptionsbanden im IR-Spektrum gefunden (ν_{\max} 1755 cm⁻¹, 1345 cm⁻¹). Das ¹³C-NMR-Spektrum von **1** enthielt ein auf ein Lakton hinweisendes Signal bei δ 174,4 (s), fünf Signale für vollständig substituierte olefinische C-Atome und drei Signale für olefinische CH-Atome (Tabelle 18). Diese und die ¹H-NMR-Daten (Tabelle 17) bewiesen vier olefinische Doppelbindungen und eine Carbonyl-Funktion als einzige Mehrfachbindungen im folglich bizyklischen Molekül. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Signale für CH₂-1, CH-2, und C-3 deuten auf ein α,β -ungesättigtes Lakton hin (Tabelle 17 und 18). Ein Literaturvergleich der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten aus Tabelle 17 und 18 zeigte, dass **1** eine Teilstruktur ähnlich Isodehydroluffariellolid (**3**), Substruktur I, und eine zweite Teilstruktur ähnlich Manoalide, Substruktur II, enthielt (Abbildung 5).^{86,161} Die ¹H- und ¹³C-Resonanzen von CH₂-1, CH-2, und C-25 (Substruktur I) und von C-14 bis CH₃-22 (Substruktur II) konnten zugeordnet werden (Tabelle 17, Tabelle 18). $\delta(^1\text{H})$ -, $\delta(^{13}\text{C})$ -Werte und Kopplungen im ¹H,¹H-COSY zeigten, dass eine weitere Isoprenoid-Einheit, Substruktur III (C-9 bis C-23), im Molekül enthalten war (Tabelle 17 und 18, Abbildung 5 und 6 a). Das β -substituierte Butenolid (Substruktur I) konnte durch die in Abbildung 6 a und b dargestellten ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹³C-HMBC-Korrelationen eindeutig gesichert werden (vgl. auch Tabelle 17 und 18). Substruktur II wurde mit ¹H,¹H-COSY- und ¹H,¹³C-HMBC-Spektren aufgeklärt. Die hierfür wichtigen Kopplungen sind qualitativ in Abbildung 6 a und b und quantitativ in Tabelle 17 und 18

wiedergegeben. ^1H , ^{13}C -Fernkopplungen von den C-Atomen C-7 bis C-14, C-23 und C-24 zu den in Tabelle 18 angegebenen Protonen ergaben aus den Substrukturen I bis III die Struktur des Sesterterpens **1**, was durch die Superposition aller abgeleiteter Strukturelemente in Abbildung 6 c verdeutlicht wird. Durch die ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen der Methylgruppen C-23 (δ 16,0) und C-24 (δ 16,1) wurden die *E*-Konfigurationen der Doppelbindungen $\Delta^{6,7}$ und $\Delta^{10,11}$ bewiesen.¹⁶⁸

Für das Sesterterpen **2** wurde durch massenspektrometrische Analyse die Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ gefunden. Signifikante Fragmentationen in der EIMS-Analyse wurden bei m/z 414 $[\text{M}]^+$ und 369 $[\text{M} - \text{OC}_2\text{H}_5]^+$ beobachtet. Fragmentationen bei m/z 290, 272 und 137 ließen vermuten, dass **2** ein -O-C₂H₅ Derivat von **1** war. Durch Banden im IR-Spektrum bei 1770 cm^{-1} und 1340 cm^{-1} konnte gezeigt werden, dass **2** ebenfalls eine α,β -ungesättigte Laktonfunktion besaß. Ein Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von **2** mit den Daten der Verbindung **1** unterstützte diese Hypothese (Tabelle 17 und 18). Signifikante Unterschiede traten nur bei Resonanzen auf, die dem α,β -ungesättigten Lakton und einer Ethoxy-Gruppe (CH₂-26, CH₃-27) zuzuordnen waren. Durch Tieffeldverschiebungen der Resonanzen von C-1 (δ 101,5 (d)) und H-1 (δ 5,78 (d, $J_{\text{HH}} = 1,5$ Hz)) bei **2** im Vergleich mit dem Sesterterpen **1** wurde gezeigt, dass die Ethoxy-Gruppe an diesem C-Atom gebunden sein musste. NMR-Daten von weiteren Strukturen mit diesem Substitutionsmuster am Butenolidring wurden von Cimino *et al.* beschrieben und bestätigten diese Zuordnung.¹⁶⁹ Weitere NMR-Messungen von **2**, wie ^1H , ^1H -COSY und ^1H , ^{13}C -HMBC (Tabelle 17 und 18) sicherten diese Struktur zusätzlich ab. Mit den hier beschriebenen Daten konnte die Struktur von **2**, welches das 1-O-Ethyl-Derivat von **1** darstellte, eindeutig aufgeklärt werden (Abbildung 4). Da jedoch die Probe des Schwammes in EtOH konserviert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass **2** kein Naturstoff im eigentlichen Sinn, sondern ein Artefakt ist.

Die Probe enthielt weitere Sesterterpene, von denen Isodehydroluffariellolid (**3**) durch Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Daten mit denen der bereits beschriebenen Verbindung identifiziert werden konnte (Abbildung 4).⁸⁶

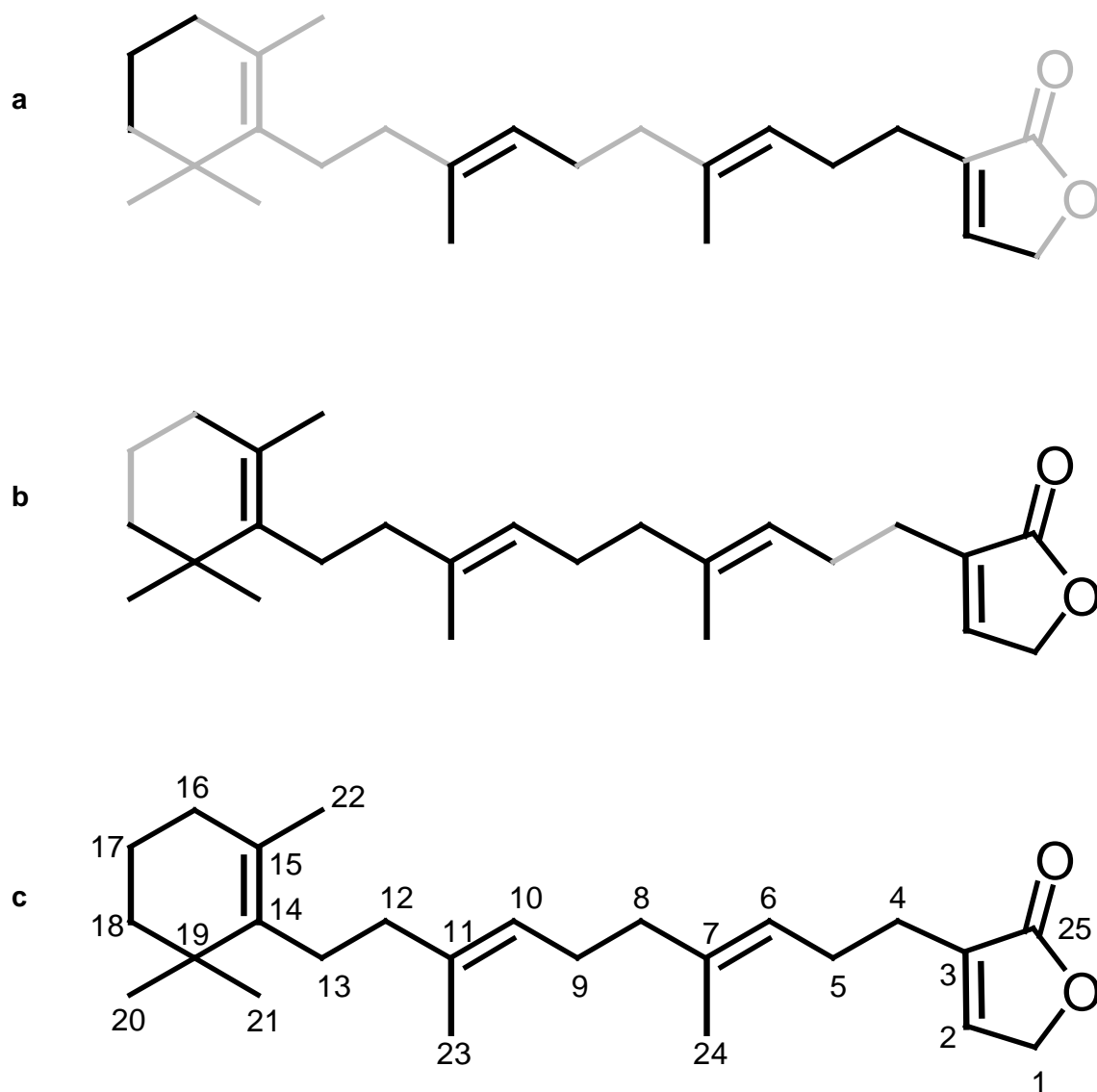


Abbildung 6: Strukturelemente abgeleitet aus NMR-Daten von **1**

a: Strukturelemente basierend auf $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum

b: Strukturelemente basierend auf $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum

c: Superposition der Strukturelemente

Zusammen mit den Sesterterpenen wurden die beiden Alkaloide Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) isoliert. ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Daten von Homofascaplysin A (**4**) waren abhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Die chemischen Verschiebungen gemessen in CD_3OD unterschieden sich deutlich von den bereits publizierten,⁸⁶ die in CDCl_3 bestimmt worden waren. Ebenfalls musste festgestellt werden, dass **4** nur sehr schlecht in CDCl_3 löslich war, so dass entsprechende NMR-Daten hiermit nur schwierig zu erhalten waren. In CD_3OD löste sich Homofascaplysin A (**4**) jedoch sehr gut, und die komplette Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten konnten unter Routinebedingungen erhalten werden (siehe S. 61).

Fascaplysin (**5**) wurde durch FAB-MS-Messungen und ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie identifiziert. Das FAB-MS-Spektrum enthielt ein intensives Signal bei m/z 271 [M^+] entsprechend der Summenformel $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten entsprachen den Literaturangaben (Tabelle 19).¹⁶⁷ Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Resonanzen von Fascaplysin (**5**) erfolgte durch Roll *et al.*¹⁶⁷ unvollständig und wurde in dieser Arbeit überprüft und vervollständigt. Ein ^1H , ^{13}C -HMQC-Spektrum erlaubte die eindeutige Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale zu den 10 CH-Gruppen von Fascaplysin (**5**) (Tabelle 19). ^1H , ^1H -Kopplungen im ^1H , ^1H -COSY zusammen mit räumlichen Wechselwirkungen bewiesen durch 2D-ROESY-Korrelationen führten zur Ableitung der in Abbildung 7 a dargestellten Strukturelemente. Die hierfür signifikanten ^1H , ^1H -Kopplungen sind quantitativ aus Tabelle 19 zu entnehmen. Um die verbleibenden acht quarternären C-Atome zuzuordnen, wurde ein ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum aufgenommen. In Abbildung 7 b ist das sich aus den ^1H , ^{13}C -Fernkopplungen (Tabelle 19) ergebende Strukturelement eingetragen, welches für die Zuordnung relevante Informationen beinhaltet. Korrelationen im ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum zwischen C-12a und H-7 und C-12b und H-6 und H-7 zusammen mit den jeweiligen ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen ermöglichten die Zuordnung aller quartären C-Atome. $\delta(^{13}\text{C})$ von 133,7 (C-12a) ist typisch für ein C-Atom, das in dem aromatischen Fünfringsystem eines Indolgerüsts α -ständig zum Stickstoff liegt. $\delta(^{13}\text{C})$ von 124,1 (C-12b) lässt sich gut mit einem aromatischen C-Atom direkt benachbart zum quartären Ringstickstoffatom und einer exocyclischen Carbonylgruppe erklären (Abbildung 7 c). Ein Literaturvergleich mit Reticulatin¹⁷⁰ und Strychnoxanthin¹⁷¹ bestätigte diese Zuordnungen zusätzlich.

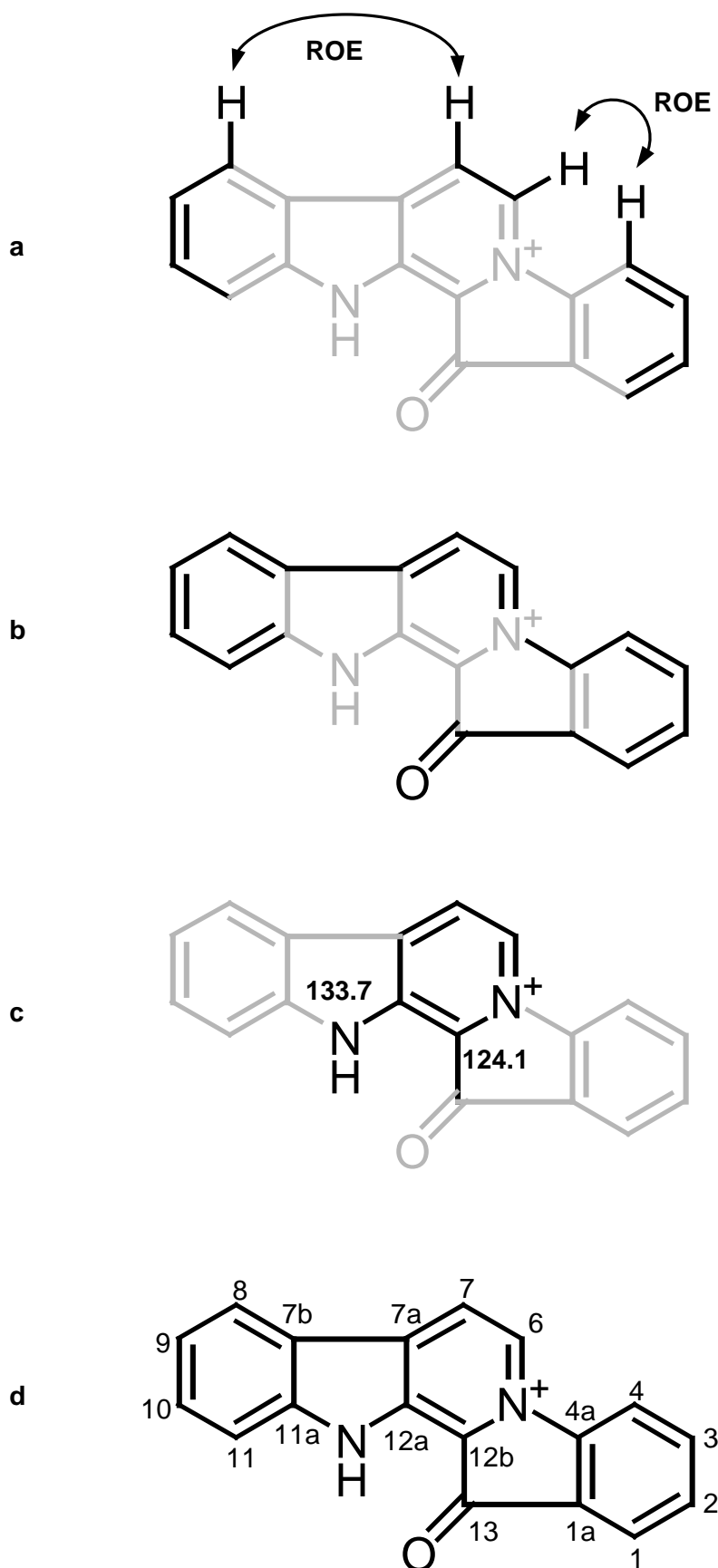


Abbildung 7: Strukturelemente abgeleitet aus NMR-Daten von Fascaplysin (**5**)
a: Strukturelemente abgeleitet aus ^1H , ^1H -COSY- und ^1H , ^1H -ROESY-Spektren
b: Strukturelement abgeleitet aus ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum
c: Strukturelement abgeleitet aus ^1H , ^{13}C -HMBC-Spektrum und $\delta(^{13}\text{C})$ -Werten
d: Superposition der Strukturelemente

3.2.1.1 Biologische Aktivitäten von *Hyrtios cf. erecta*

In Agar-Diffusions-Tests (siehe 2.4.3) hemmte der CH₂Cl₂ und der MeOH-Extrakt von *Hyrtios cf. erecta* das Wachstum der Bakterien *E. coli* (50 µg/6 mm WH (CH₂Cl₂-Extrakt) bzw. 4 mm TH (MeOH-Extrakt)), und *B. megaterium* (50 µg/8 mm bzw. 6 mm TH), und den Pilzen *U. violacea* (50 µg/1 mm bzw. 2 mm WH), *E. repens* (50 µg/3 mm WH, nur CH₂Cl₂-Extrakt), und *M. microspora* (50 µg/1 mm bzw. 2 mm WH). Die antimikrobiellen Wirkungen der Extrakte ließen sich teilweise durch die Aktivitäten der Reinsubstanzen erklären: Verbindung **1** zeigte schwache antifungale Aktivität gegenüber *U. violacea* (50 µg/2 mm WH), Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) waren antibakteriell wirksam gegenüber *E. coli* (50 µg/9 mm bzw. 6 mm WH) und *B. megaterium* (50 µg/11 mm bzw. 10 mm TH).

Tabelle 15: HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Hemmung durch Isodehydroloffariellolid (**3**), Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**)^a

Substanz	RT-Hemmung	Konzentration	PTK-Hemmung	Konzentration
Isodehydroloffariellolid (3)	n. a.	0,2 mM	50 ^b	0,5 mM
Homofascaplysin A (4)	n. a.	0,2 mM	8 ^b	0,6 mM
			44 ^c	0,3 mM
Fascaplysin (5)	11 ^c	0,12 mM	10 ^d	0,7 mM

^a HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Test (siehe 2.4.1 bzw. 2.4.2), Enzymrestaktivität in %, n. a. = nicht aktiv; ^b Mittelwert (n = 2); ^c Mittelwert (n = 4); ^d Mittelwert (n = 3)

Hemmungen der HIV-1-RT und p56^{lck}-PTK durch die Extrakte sind in der vorliegenden Arbeit bereits beschrieben worden (siehe 3.1.1 und 3.2). Als Inhibitoren der PTK p56^{lck} wirkten Isodehydroloffariellolid (**3**), Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**), einziger identifizierter HIV-1-RT-Hemmstoff war Fascaplysin (**5**) (Tabelle 15).

Fascaplysin (**5**) wurde auf antivirale Wirkungen gegenüber verschiedenen HAV-Formen in FRhK-4-Zellkulturen untersucht. Bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen (0,038 µg/ml) trat der cytopathogene Effekt des HAV (Stamm HAVcytHB1.1) verstärkt und früher auf als bei unbehandelten infizierten FRhK-4-Zellen. Bei persistentem HAV (Stamm HAV-PI) trat ein cytopathogener Effekt bei 0,038 µg/ml Fascaplysin (**5**) im Unterschied zu unbehandelten infizierten FRhK-4-Zellen auf.

Die Aktivitäten von Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) gegen *Trypanosoma brucei* ssp. *rhodesiense* und *T. cruzi* sowie gegen *Plasmodium falciparum* wurden in Zellkulturen untersucht (siehe 2.4.6, 2.4.7). Fascaplysin (**5**) hemmte die Erreger der Schlafkrankheit, *T. brucei* ssp. *rhodesiense* (IC₅₀ 0,17 µg/ml bzw. 630 nM) mit moderater Potenz im

Vergleich zu Melarsoprol (IC_{50} 2 ng/ml).¹⁴⁷ Zytotoxizitätstests von Fascaplysin (**5**) an L-6-Zellen ergaben eine MIC von 1,2 µg/ml (siehe 2.4.4), und damit eine als schwach selektiv anzusehende antiplasmodiale Wirkung von **5** (Tabelle 16). Die Erreger der Chagas-Krankheit, *T. cruzi*, wurden von Fascaplysin (**5**) ebenfalls gehemmt (IC_{50} 0,58 µg/ml bzw. 2140 nM).

Tabelle 16: Antiplasmodiale Aktivität (IC_{50} -Werte) und Zytotoxizität (MIC) von Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**):

Substanz	<i>Plasmodium falciparum</i> Stamm ^a		Zytotoxizität ^b	
	K1 [ng/ml]	NF54 [ng/ml]	L-6 [µg/ml]	Makrophagen [µg/ml]
Homofascaplysin A (4)	14 ^c (43 nM)	24 ^c (73 nM)	1,1	30
Fascaplysin (5)	50 ^d (185 nM)	34 ^d (126 nM)	2,5 ^c	-
Chloroquin	54 ^e	4 ^e	-	-
Artemisinin	1 ^e	2 ^e	-	-

^a Antiplasmodiale Aktivität (siehe 2.4.6); ^b Zytotoxizität (siehe 2.4.4); ^c Mittelwert (n = 2);

^d Mittelwert (n = 3); ^e Mittelwert (n = 4)

Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) waren in vitro potente Hemmstoffe eines Chloroquin-resistenten (K1) wie auch eines Chemotherapeutika-sensiblen (NF54) *P. falciparum*-Stammes (Tabelle 16). Als Standardhemmstoffe wurden Chloroquin und Artemisinin eingesetzt. Homofascaplysin A (**4**) war gegenüber dem K1-Stamm stärker wirksam als Chloroquin. Im Vergleich zu Artemisinin (K1-Stamm) und zu beiden Vergleichsstoffen beim NF54-Stamm wurden bei **4** ca. um den Faktor 10 höhere IC_{50} -Werte festgestellt. Zur Beurteilung der Selektivität wurden Zytotoxizitätstests mit L-6-Zellen und Mäuse-Makrophagen durchgeführt. Die dabei bestimmte MIC bei L-6-Zellen ergab bei Homofascaplysin A (**4**) zellschädigende Effekte bei Konzentrationen, die um den Faktor 46 (NF54) bzw. 79 (K1) höher als die IC_{50} -Werte lagen. Bei Fascaplysin (**5**) wurden um den Faktor 50 (K1) bzw. 74 (NF54) höhere MIC (L-6) verglichen mit den jeweiligen IC_{50} -Werten festgestellt (Tabelle 16).

Sesterterpen 1: hellgelbes Öl (3 mg, 0,004%); IR (Film) ν_{\max} 2925, 2855, 1755, 1455, 1375, 1345, 1070, 1055 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) siehe Tabelle 17; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75,5 MHz) siehe Tabelle 18; EIMS m/z 370 [M^+] (9), 246 (5), 233(6), 191 (17), 137 (100); HREIMS m/z 370,2860 (berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_2$: 370,2872).

Sesterterpen 2: hellgelbes Öl (3 mg, 0,004%); $[\alpha_D]$ 0° (c 0,0034, CHCl_3); IR (Film) ν_{\max} 2925, 2865, 1770, 1445, 1375, 1340, 1200, 1135, 1115, 1075, 1020, 940 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) siehe Tabelle 17; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) siehe Tabelle 18; EIMS m/z 414 [M^+] (7), 369 (1), 290 (1), 272 (2), 137 (100); HREIMS m/z 414,3123 (berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_2$: 414,3134).

Isodehydroloffariellolid (3): farbloses Öl (13 mg, 0,015%); alle weiteren Daten entsprechend der Literatur.⁸⁶

Homofascaplysin A (4): braunes Öl (25 mg, 0,03%); $[\alpha_D]$ 0° (c 0,007, MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 9,35 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-6), 8,85 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-7), 8,51 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-8), 8,29 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-4), 7,93 (1H, dd, $J = 1,0, 7,6$ Hz, H-1), 7,90 (1H, m, H-11), 7,88 (1H, m, H-10), 7,79 (1H, ddd, $J = 1,0, 7,6, 8,1$ Hz, H-3), 7,72 (1H, ddd, $J = 1,0, 7,6$ Hz, H-2), 7,56 (1H, ddd, $J = 1,5, 8,1$ Hz, H-9), 4,29 (1H, d, $J = 18,3$ Hz, H-14), 4,21 (1H, d, $J = 18,3$ Hz, H-14), 2,02 (3H, s, H-16); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100,5 MHz) δ 207,4 (s, C-15), 147,7 (s, C-11a), 145,8 (s, C-12b), 143,5 (s, C-4a), 139,6 (s, C-1a), 137,6 (s, C-7a), 135,0 (d, C-10), 133,1 (d, C-3), 132,8 (d, C-2), 126,7 (d, C-1), 125,6 (d, C-6), 125,3 (d, C-8), 124,6 (d, C-9), 122,3 (s, C-7b), 122,3 (s, C-12a), 119,3 (d, C-7), 116,1 (d, C-4), 115,0 (d, C-11), 80,1 (s, C-13), 52,4 (t, C14), 31,0 (q, C-16); alle weiteren Daten entsprechend der Literatur.⁸⁶

Fascaplysin (5): dunkelrotes Öl (50 mg, 0,06%); $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) und $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 75,5 MHz) siehe Tabelle 19; pos. FAB-MS (Matrix: Glycerol) m/z 271 [M^+], alle weiteren Daten entsprechend der Literatur.¹⁶⁷

Tabelle 17: $^1\text{H-NMR}$ -Daten für die Sesterterpene 1 und 2

Proton	Verbindung 1 $\delta(^1\text{H})^a$	Verbindung 1 $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}^b$	Verbindung 2 $\delta(^1\text{H})^c$	Verbindung 2 $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}^b$
1	4,76 (d, $J = 1,6$ Hz)	H-2, H-4	5,78 (d, $J = 1,5$ Hz)	H-2, H-4
2	7,09 (t, $J = 1,6$ Hz)	H-1, H-4	6,75 (d, $J = 1,5$ Hz)	H-1, H-4
4	2,34 (m)	H-1, H-2, H-5	2,33 (m)	H-1, H-2, H-5, H-6
5	2,27 (m)	H-4, H-24	2,25 (m)	H-4, H-6, H-24
6	5,12 (m)	H-4, H-5, H-24	5,1 (m)	H-4, H-5, H-24
8	2,03 (m)	-	1,99 (m)	-
9	2,07 (m)	H-10	2,06 (m)	H-10, H-23
10	5,12 (m)	H-9, H-23	5,1 (m)	H-9, H-23
12	2,02 (m)	-	2,01 (m)	-
13	2,03 (m)	-	2,02 (m)	-

Proton	Verbindung 1 $\delta(^1\text{H})^a$	Verbindung 1 $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}^b$	Verbindung 2 $\delta(^1\text{H})^c$	Verbindung 2 $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}^b$
16	1,90 (dd, $J = 6,2, 6,2$ Hz)	H-17, H-18	1,89 (dd, $J = 6,1, 6,1$ Hz)	H-17, H-18
17	1,55 (m)	H-16, H-18	1,55 (m)	H-16, H-18
18	1,41 (m)	H-16, H-17	1,41 (m)	H-16, H-17, H-20, H-21
20	0,99 (s)	-	0,98 (s)	-
21	0,99 (s)	-	0,98 (s)	-
22	1,60 (s)	-	1,59 (s)	-
23	1,64 (s)	H-10	1,63 (s)	H-10
24	1,61 (s)	H-6	1,60 (s)	H-6
26	-	-	3,9 (dq, $J = 7,1, 9,2$ Hz) 3,72 (dq, $J = 7,1, 9,2$ Hz)	H-27
27	-	-	1,27 (t, $J = 7,1$ Hz)	H-26

^a CDCl₃, 300 MHz; ^b Für die Strukturaufklärung relevante Kopplungen; ^c CDCl₃, 400 MHz

Tabelle 18: ¹³C-NMR-Daten der Sesterterpene 1 und 2

C-Atom	Verbindung 1 $\delta(^{13}\text{C})^a$	Verbindung 1 $^1\text{H}, ^{13}\text{C-HMBC}^b$	Verbindung 2 $\delta(^{13}\text{C})^c$	Verbindung 2 $^1\text{H}, ^{13}\text{C-HMBC}^b$
1	70,1 (t)	-	101,5 (d)	-
2	144,2 (d)	-	142,2 (d)	-
3	134,0 (s)	H-4, H-5	138,1 (s)	H-1, H-2, H-4, H-5
4	25,5 (t)	-	25,5 (t)	-
5	25,7 (t)	-	25,4 (t)	-
6	123,4 (d)	-	122,4 (d)	-
7	136,8 (s)	H-5, H-8, H-24	137,0 (s)	H-5, H-8, H-24
8	39,7 (t)	H-6, H-9, H-24	39,7 (t)	H-9, H-24
9	26,6 (t)	H-8, H-10	26,6 (t)	H-8, H-10, H-23
10	122,7 (d)	H-9, H-12, H-23	123,4 (d)	H-9, H-23
11	136,2 (s)	H-9, H-12, H-23	136,2 (s)	H-9, H-12, H-23
12	40,3 (t)	H-10, H-13, H-23	40,3 (t)	H-13, H-23
13	28,0 (t)	H-12	28,0 (t)	H-12
14	137,1 (s)	H-13, H-20, H-21, H-22	137,2 (s)	H-13, H-20, H-21, H-22
15	126,9 (s)	H-13, H-16, H-22	126,9 (s)	H-13, H-16, H-22
16	32,8 (t)	-	32,8 (t)	-
17	19,5 (t)	-	19,6 (t)	-
18	39,9 (t)	-	39,9 (t)	-
19	35,0 (s)	H-18, H-20, H-21	35,0 (s)	H-18, H-20, H-21
20	28,6 (q)	H-18, H-21, H-22	28,6 (q)	H-18, H-21, H-22
21	28,6 (q)	H-18, H-20, H-22	28,6 (q)	H-18, H-20, H-22
22	19,8 (q)	H-16	19,8 (q)	-
23	16,0 (q)	H-10, H-12	16,0 (q)	H-10
24	16,1 (q)	H-6, H-8	16,1 (q)	H-6, H-8
25	174,4 (s)	H-1, H-2, H-4	171,5 (s)	H-1, H-2, H-4
26	-	-	65,8 (t)	H-1, H-27
27	-	-	15,1 (q)	H-26

Multiplizität durch BB und DEPT, s = C, d = CH, t = CH₂, q = CH₃; ^a CDCl₃, 75,5 MHz; ^b Für die Strukturaufklärung relevante Kopplungen; ^c CDCl₃, 100,6 MHz

Tabelle 19: ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten von Fascaplysin (**5**)

C-Atom	$\delta(^{13}\text{C})^{\text{a}}$	$\delta(^1\text{H})^{\text{b}}$	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY ^c	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -ROESY	$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC ^c
1a	126,2 (s)	-	-	-	H-2, H-3, H-4
1	127,6 (d)	8,11 (dd, $J = 1,3, 7,5 \text{ Hz}$)	H-2	H-2	-
2	133,5 (d)	7,80 (ddd, $J = 0,9, 7,5, 7,5 \text{ Hz}$)	H-1, H-3	H-1, H-3	-
3	139,2 (d)	8,03 (ddd, $J = 1,3, 8,0, 8,0 \text{ Hz}$)	H-2, H-4	H-2, H-4	-
4	117,3 (d)	8,37 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$)	H-3	H-3, H-6	-
4a	149,4 (s)	-	-	-	H-1, H-2, H-3, H-4, H-6
6	128,4 (d)	9,41 (d, $J = 6,2 \text{ Hz}$)	H-7	H-4, H-7	-
7	121,9 (d)	9,00 (d, $J = 6,2 \text{ Hz}$)	H-6	H-6, H-8	-
7a	143,6 (s)	-	-	-	H-6, H-7, H-8, H-9
7b	121,9 (s)	-	-	-	H-7, H-8, H-9, H-10, H-11
8	125,9 (d)	8,53 (d, $J = 8,0 \text{ Hz}$)	H-9, H-10, H-11	H-7, H-9	-
9	125,4 (d)	7,59 (ddd, $J = 0,9, 7,1, 8,0 \text{ Hz}$)	H-8, H-10, H-11	H-8, H-10	-
10	136,7 (d)	7,94 (ddd, $J = 1,3, 7,1, 8,4 \text{ Hz}$)	H-8, H-9, H-11	H-9, H-11	-
11	115,4 (d)	7,86 (dd, $J = 0,9, 8,4 \text{ Hz}$)	H-9, H-10	H-10	-
11a	149,6 (s)	-	-	-	H-8, H-9, H-10, H-11
12a	133,7 (s)	-	-	-	H-7
12b	124,1 (s)	-	-	-	H-6, H-7
13	183,9 (s)	-	-	-	H-1, H-2, H-4

Multiplizität durch BB und DEPT, s = C, d = CH, t = CH₂, q = CH₃; ^a CD₃OD, 75,5 MHz; ^b CD₃OD, 400 MHz; ^c Für die Strukturaufklärung relevante Kopplungen

3.2.2 *Xestospongia rosariensis*

Aus Schwämmen der Gattung *Xestospongia* (Familie: Petrosidae, Ordnung: Petrosida oder Haplosclerida) ist eine große Zahl von Naturstoffen mit biologischen Wirkungen bekannt. Dazu gehören die Histaminfreisetzung hemmende Steroide¹⁷² und HIV-Protease inhibierende bromierte Polyacetylene.¹⁷³ Aus *Xestospongia* sp. wurde auch eine große Anzahl Alkaloide isoliert wie z. B. Isochinolin-Chinone¹⁷⁴, β -Carbolin-Alkaloide wie Manzamine, von welchen einige antimikrobielle und insektizide Wirkungen besaßen,¹⁷⁵ die vasodilatorisch wirksamen Xestospongine A-D¹⁷⁶ und der Protein-Kinase-C-Inhibitor Xestocyclamin A¹⁷⁷.

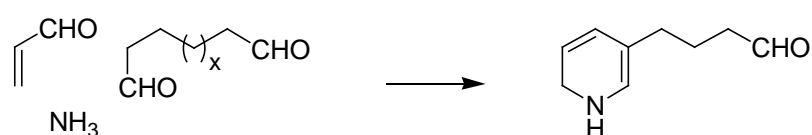


Abbildung 8: Vorgeschlagener Biogeneseweg für 3-Alkylpyridin-Derivate (nach Ref. 178)

Der vermutliche Biogeneseweg von stickstoffhaltigen Naturstoffen wie Xestosponginen und Xestocyclamin A beginnt mit Ammoniak, Propenal und linearen Dialdehyden und enthält als Zwischenprodukt 3-Alkylpyridin-Einheiten (Abbildung 8).¹⁷⁸ Das oligomere Pyridiniumsalz Halitoxin ist ebenfalls aus solchen Bausteinen aufgebaut und wurde erstmals aus Schwämmen der Gattung *Haliclona* (Familie: Chalinidae, Ordnung: Haplosclerida) isoliert, die später als zur Gattung *Amphimedon* (Familie: Niphatidae, Ordnung: Haplosclerida) zugehörig erkannt wurden.¹⁷⁹ Schmitz *et al.* beschrieben die Zytotoxizität, die hämolytische und fischtoxische Aktivität und die Toxizität von Halitoxin gegenüber Mäusen.¹⁷⁹ Nachfolgend wurden weitere pharmakologische Charakteristika von Halitoxin aus *Amphimedon viridis* beschrieben: die Neurotoxizität an Crustaceen-Nerven und antimitotische Wirkung an Seeigelleiern. Die bereits bekannte Toxizität bei Mäusen konnte hier u. a. durch die hämolytische Aktivität der Substanz erklärt werden.¹⁸⁰

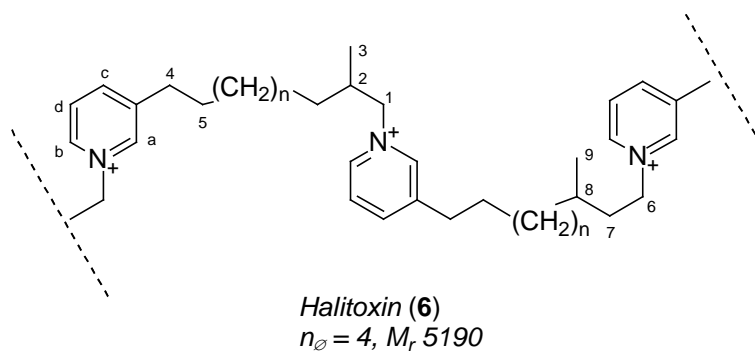


Abbildung 9: Strukturformel des aus *Xestospongia rosariensis* isolierten Halitoxins (6)

Die komplette Hemmung von HIV-1-RT im Screening (siehe 3.1.1, 3.2) war Grund für die detaillierte Untersuchung des MeOH-Extraktes von *Xestospongia rosariensis* in dieser Arbeit. Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen MeOH/H₂O und n-Butanol und anschließende zweimalige VLC-Fraktionierung der n-Butanol-Fraktion führte zur Isolierung des für die HIV-1-RT-Hemmung verantwortlichen Halitoxins (**6**). Die Substanz wurde durch ihre spektroskopischen Daten identifiziert. Maxima in UV- und Absorptionsbanden in IR-Spektren stimmten mit Literaturwerten überein.¹⁷⁹ In ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden Signale gefunden, die identisch mit den von Schmitz *et al.* und von Berlinck *et al.* beschriebenen waren.^{179,180} Halitoxin (**6**) setzte sich aus zwei verschiedenen 3-Alkylpyridin-Einheiten zusammen, die sich nur durch die Stellung der CH₃-Gruppe an C-2 bzw. an C-8 unterschieden. Die Integrale von H₃₋₉ (δ 1,06 (d, J_{HH} = 6,6 Hz)) und H₃₋₃ (δ 0,93 (d, J_{HH} = 6,6 Hz)) verhielten sich im ¹H-NMR-Spektrum wie 1 : 3,6. Dies zeigte deutlich, dass das hier isolierte Halitoxin (**6**) bevorzugt am C-2 methyliert war. Die durchschnittliche (CH₂)_n-Kettenlänge wurde aus dem Integral abgeleitet und lag bei n = 4. Sowohl das von Schmitz *et al.* aus *Haliclona* sp. wie auch das von Berlinck *et al.* aus *Amphimedon viridis* isolierte Halitoxin besaß die gleiche qualitative Zusammensetzung aus an C-2 bzw. an C-8 methylierten 3-Alkylpyridin-Einheiten. Halitoxin aus verschiedenen Quellorganismen kann sich im Molekulargewicht unterscheiden, z. B. fanden Schmitz *et al.* durch Membranfiltration Fraktionen von 500 – 1000, 1000 – 25000 und über 25000, Berlinck *et al.* charakterisierten mit Hilfe der Gelchromatographie Fraktionen von 500, 2000 und 5000.^{179,180} Die relative Molekülmasse des hier isolierten Halitoxins (**6**) von M_r 5190 wurde durch eine MALDI/TOF-MS-Analyse bestimmt.¹⁸¹

3.2.2.1 Biologische Aktivitäten von *Xestospongia rosariensis*

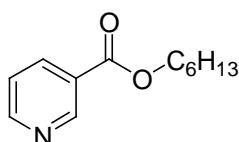
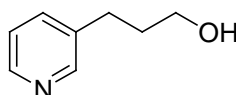
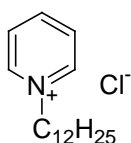
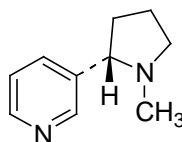
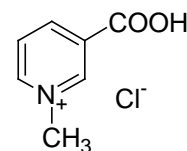
In Agar-Diffusions-Tests verursachten der MeOH- und CH₂Cl₂-Extrakt von *Xestospongia rosariensis* eine schwache Wachstumshemmung von *B. megaterium* (50 µg/2 mm TH), der MeOH-Extrakt hemmte zusätzlich *U. violacea* (50 µg/1 mm TH). Entsprechende Aktivitäten zeigte auch Halitoxin (**6**): es wurde eine schwache antibakterielle Wirkung auf *B. megaterium* (50 µg/2 mm TH) und eine schwache antifungale Wirkung gegenüber *U. violacea* (50 µg/1 mm WH) festgestellt.

Tabelle 20: HIV-1-RT-Hemmung durch Halitoxin (6)

Konzentration		RT-Hemmung ^a		
[µg/ml]	µM	Probe 1	Probe 2	Probe 3
6,7	1,28	13,0	11,0	20,6
5,3	1,02	32,8	36,7	47,4
4,4	0,85	49,5	54,7	71,0
3,8	0,73	67,7	79,7	65,4
3,3	0,64	74,0	86,7	79,5

^a Biologische Aktivität (siehe 2.4.1), Proben 1-3: drei unterschiedliche Einwaagen von Halitoxin (6), alle Werte sind Mittelwerte aus n = 3 Messwerten

Halitoxin (6) erklärte auch die komplette Hemmung der HIV-1-RT durch den MeOH-Extrakt (siehe 3.1.1, 3.2). In Verdünnungsreihen wurde gezeigt, dass die 50% Hemmung von HIV-1-RT bei Konzentrationen zwischen 0,73 und 1,02 µM Halitoxin (6) liegen musste (Tabelle 20).

*Nicotinsäurehexylester**Hydroxypropylpyridin**Hydroxypyridin Ethobromid**Dodecylpyridiniumchlorid**Nicotin**Trigonellinchlorid***Abbildung 10:** Pyridinderivate für HIV-1-RT-Tests

Mit niedermolekularen Modellverbindungen, die eine 3-substituierte Pyridin-Grundstruktur besaßen, wurde getestet, ob durch Halitoxin-ähnliche Strukturelemente eine Hemmung von HIV-1-RT erreicht werden konnte. Von den ausgewählten 6 Substanzen hemmte keine das Enzym (Abbildung 10). Das hier untersuchte Trigonellin kommt auch in marinen Tieren vor und spielt eine Rolle bei der osmotischen Druckregulation dieser Organismen.^{182,183} 1997 wurde Trigonellin z. B. aus dem Schwamm *Astrosclera willeyana* (Familie: Agelasidae, Ordnung: Axinellida) isoliert.¹⁸⁴

Tabelle 21: Antiplasmodiale Aktivität und Zytotoxizität von Halitoxin (**6**): IC₅₀-Werte

<i>Plasmodium falciparum</i> Stamm FCR3F86 ^a		Zytotoxizität KB-Zellen ^b	
[µg/ml]	µM	[µg/ml]	µM
4,2	0,81	7,3	1,4

^a Antiplasmodiale Aktivität (siehe 2.4.6) Mittelwert (n = 2) Atovaquone als Standard: IC₅₀-Wert 0,4 ng/ml; ^b Zytotoxizität (siehe 2.4.4) Mittelwert (n = 3)

Weitere biologische Aktivitäten von Halitoxin (**6**) wurden in Untersuchungen mit *Plasmodium falciparum* festgestellt (Tabelle 21). Die Substanz war schwach aktiv im Vergleich mit dem Standardhemmstoff Atovaquone. Durch Zytotoxizitätstests an KB-Zellen wurde außerdem die geringe Selektivität von Halitoxin (**6**) gezeigt, ausgedrückt im Selektivitätsindex von 1,7, dem Quotient aus beiden IC₅₀-Werten (Zytotoxizität/Antiplasmodiale Aktivität).

Halitoxin (6): hellbraunes amorphes Pulver (45 mg, 0,04%); [α_D] +2° (0,0013, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 215 nm (Schulter), 267 nm (4,8), 274 nm (Schulter); IR (Film) ν_{\max} 3150 cm⁻¹, 3000 cm⁻¹, 1655 cm⁻¹; MALDI/TOF m/z 5189 \pm 0,1% [M⁺]; ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) und ¹³C-NMR (CD₃OD, 75,5 MHz) und alle weiteren beschriebenen Daten entsprechend der Literatur.^{179,180}

3.2.3 *Amphimedon* sp.

Amphimedon Arten gehören zur Familie Niphatidae (Ordnung: Haplosclerida) und zeichnen sich ebenso wie *Xestospongia* sp. (siehe 3.2.2) besonders durch das Vorkommen von stickstoffhaltigen Naturstoffen aus. Eine Reihe von Manzaminen mit zytotoxischer Aktivität wie Keramaphidin B¹⁸⁵ und Ircinol A und B¹⁸⁶ und das antimikrobiell wirksame Ma'eganidin A¹⁸⁷ wurden ebenso beschrieben wie die 3-Alkylpyridin-Derivate Halitoxin (siehe 3.2.2)^{179,180} und Amphitoxin aus *A. compressa*.¹⁸⁸ Die Strukturen von Halitoxin und Amphitoxin unterscheiden sich darin, dass bei Amphitoxin zusätzlich Doppelbindungen in der Alkylkette, jedoch keine Verzweigungen nachgewiesen wurden. Die ökologische Funktion von Amphitoxin wurde in Fütterungsexperimenten in Aquarien mit dem Raubfisch *Thalassoma bifasciatum* untersucht. Bei Konzentrationen von 1 mg/ml Amphitoxin im Nahrungspellet, welche 1/6 des natürlichen Vorkommens von Amphitoxin in *A. compressa* entsprach, nahm der Fisch die Nahrung nicht auf.¹⁸⁸

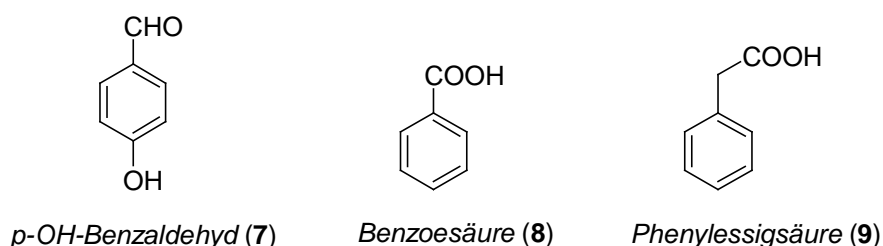


Abbildung 11: Strukturformeln der aus *Amphimedon* sp. isolierten Verbindungen

Der MeOH-Extrakt des in dieser Arbeit untersuchten Schwammes *Amphimedon* sp. fiel durch starke Hemmung von HIV-1-RT im Screening auf (siehe 3.1.1, 3.2). In der ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchung (CD₃OD, 400 MHz) des methanolischen Rohextraktes wurden vier für 1,3-substituierte Pyridiniumsalze charakteristische Signale zwischen δ 8 und δ 9 sowie weitere Signale bei δ 5,4, 4,6, 2,9, 2,0, 1,75, 1,4 und 1,0 gefunden. Diese ¹H-NMR-Daten sprachen für 3-Alkylpyridin-Derivate wie z. B. Halitoxin und Amphitoxin (siehe auch 3.2.2).^{179,180,188} Weitere Analysen des MeOH-Extraktes mit MALDI/TOF-MS zeigten Substanzen im Massebereich um 8000. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass ein 3-Alkylpyridin-Oligomer, ähnlich Halitoxin, im Extrakt enthalten war, das die HIV-1-RT-Hemmung verursachte. Die Reinigung dieses Rohextraktes und eine weitere Charakterisierung des 3-Alkylpyridin-Oligomers wurde deshalb nicht durchgeführt. Weiterhin wurden der CH₂Cl₂-Extrakt von *Amphimedon* sp. durch VLC getrennt und die erhaltenen Fraktionen ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Dabei konnten in 3 Fraktionen aromatische Inhaltsstoffe nachgewiesen werden. Die Reinigung dieser Fraktionen durch Normalphasen-HPLC führte zur Isolierung von *p*-OH-Benzaldehyd (7), Benzoessäure (8) und Phenyllessigsäure (9), die

durch ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und GC-MS-Analysen identifiziert wurden (Abbildung 11).

3.2.3.1 Biologische Aktivitäten von *Amphimedon* sp.

In Agar-Diffusions-Tests zeigte der CH_2Cl_2 -Extrakt von *Amphimedon* sp. eine schwach antifungale Wirkung gegenüber *U. violacea* (50 $\mu\text{g}/1\text{ mm WH}$).

In den enzymatischen Tests wurde HIV-1-RT durch den MeOH-Extrakt stark gehemmt. Die Restaktivitäten des Enzyms lagen bei 2 bzw. 4% (siehe 3.1.1 bzw. 3.2). ^1H -NMR und MALDI/TOF-MS wiesen auf 3-Alkylpyridine als potentielle Enzymhemmstoffe hin. Die Enzymhemmung durch solche Verbindungen wurde an Halitoxin (**6**) aus *Xestospongia rosariensis* ausführlich untersucht (siehe 3.2.2.1).

p-OH-Benzaldehyd (7): hellgelbes kristallines Pulver (9 mg, 0,004%); GC-EIMS m/z 122 [M^+] (90), 121 (100), 93 (33), 65 (27); MS-Daten entsprechend den Vergleichsdaten in der Spektrenbibliothek des Institutes für Organische Chemie, TU Braunschweig, Signale im ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 200 MHz) entsprechend der Literatur.¹⁸⁹

Benzoessäure (8): hellgelbes kristallines Pulver (18 mg, 0,008%); Signale in ^1H -NMR- (CDCl_3 , 400 MHz) und ^{13}C -NMR-Spektren (CDCl_3 , 75,5 MHz) entsprechend der Literatur.^{189,190}

Phenylelessigsäure (9): hellgelbes kristallines Pulver (15 mg, 0,007%); GC-EIMS m/z 208 [$\text{M-Si}(\text{CH}_3)_3$] (1), 193 (15), 164 (22), 91 (19), 75 (32), 73 (100); Signale im ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 200 MHz) entsprechend der Literatur.^{189,190}

3.2.4 *Dictyota volubilis*

Bei *Dictyota volubilis* handelt es sich um eine Braunalge der Familie Dictyotaceae. Der Anteil der neu entdeckten Verbindungen aus Braunalgen mit ökologischer oder pharmazeutischer Bedeutung blieb in den letzten Jahren konstant bei ca. 5% aller in den Übersichtsartikeln von Faulkner z. B. für 1996 und 1997 aufgeführten marinen Naturstoffe.^{159,191} Größere Bedeutung in der Naturstoffchemie besaßen Algen bis ca. 1983, was sich ebenfalls von Faulkner ableiten lässt.^{192,193} Die bis dahin aus Braunalgen bekannten drei Gruppen von Diterpen-Ringsystemen, Xenicane, Dolabellane und erweiterte Sesquiterpene, wurden mit vielfältigen Strukturvariationen beschrieben.¹⁹² Die antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften der Diterpene wurden ebenso untersucht wie ökologische Aspekte.

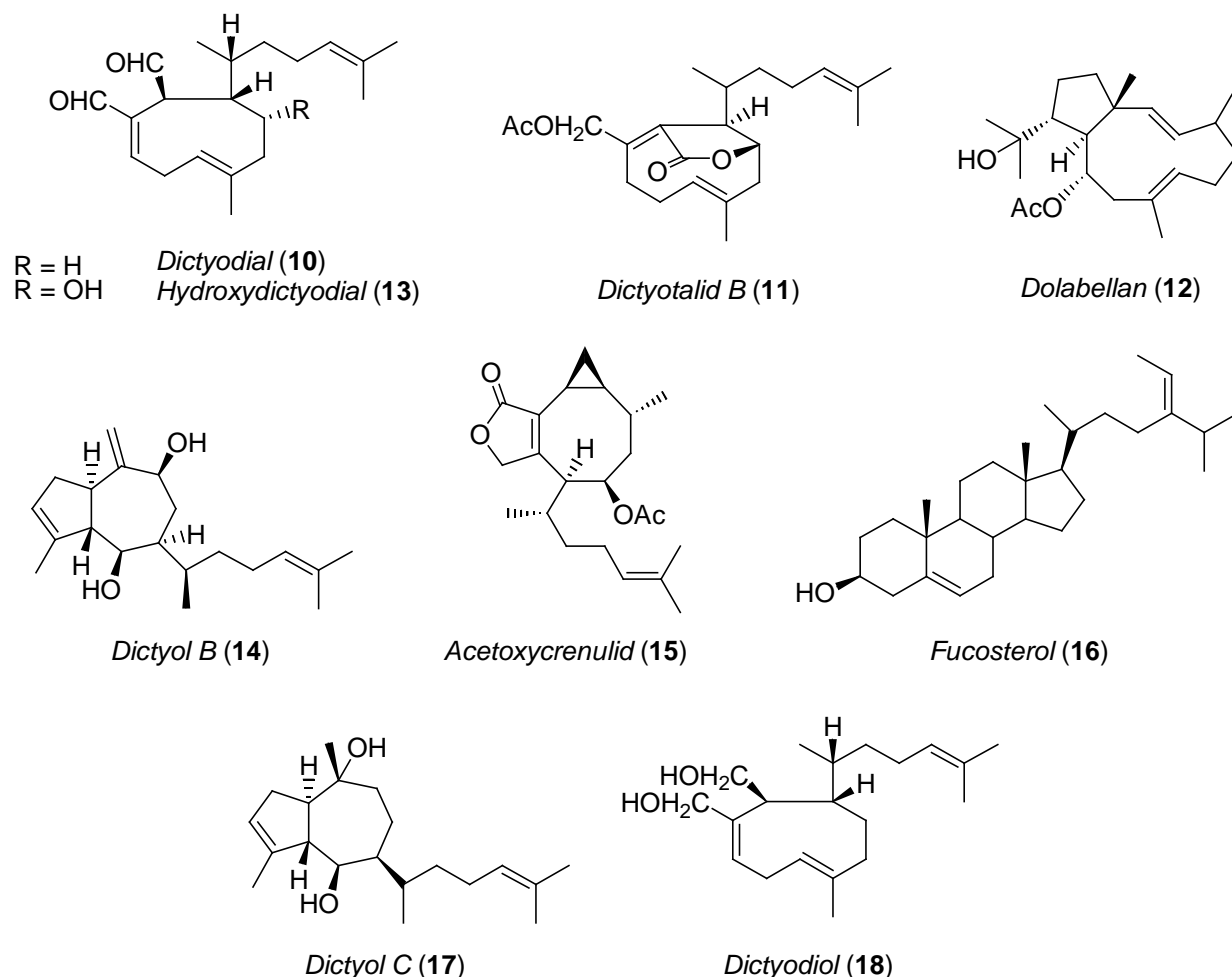


Abbildung 12: Strukturformeln der aus *Dictyota volubilis* isolierten Substanzen (10 - 17) und des Reduktionsproduktes Dictyodiol (18)

Dictyodial (10) besaß antibakterielle und antifungale Aktivitäten.¹⁹⁴ Dictyotalid B (11) zeigte Zytotoxizität gegen B16-Maus-Melanomzellen.¹⁹⁵ Die zur Gruppe der erweiterten Sesquiterpene gehörenden Acutilole aus *Dictyota acutiloba* waren Abwehrstoffe gegen pflan-

zenfressende Fische und Seeigel.¹⁹⁶ Aus der in dieser Arbeit untersuchten Braunalge *Dictyota volubilis* (Familie: Dictyotaceae) wurden Diterpene aus allen 3 genannten Strukturklassen (**10** – **15**, **17**) erhalten. Das als HIV-1-RT-Hemmstoff bereits patentierte Xenican Dictyodial (**10**),⁹⁸ andere Xenicane (**11**, **13**), erweiterte Sesquiterpene wie Dictyol B (**14**), ein Dolabellan (**12**), sowie das in Braunalgen gehäuft vorkommende Fucosterol (**16**) wurden isoliert.¹⁹⁷

In den Screening-Untersuchungen fiel der CH₂Cl₂-Extrakt von *Dictyota volubilis* durch Hemmung der HIV-1-RT-Enzymaktivität auf (siehe 3.1.1). In der anschließenden detaillierten Untersuchung von Fraktionen auf HIV-1-RT-Hemmung und Reinigung des Extraktes mittels VLC und HPLC konnte Dictyodial (**10**) isoliert werden (siehe 2.3.1). Gleichzeitig durchgeführte ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen der Fraktionen zeigten weitere Terpene an. Durch verschiedene chromatographische Trennverfahren wurden weitere Diterpene isoliert: Dictyotalid B (**11**), das aus dem Seehasen *Dolabella* sp. erstmals isolierte Dolabellan (**12**),¹⁹⁸ Hydroxydictyodial (**13**),¹⁹⁹ Dictyol B (**14**),²⁰⁰ Acetoxycrenulid (**15**),²⁰¹ Fucosterol (**16**)²⁰² und Dictyol C (**17**)²⁰³ (Details der Isolierung: siehe 2.3.1). Die Identifizierung der isolierten Substanzen erfolgte durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie, Messung der optischen Drehung und MS-Analysen (siehe S. 72 ff.). Um zu untersuchen ob die Aldehydgruppen des Dictyodial (**10**) für die HIV-1-RT-Hemmung essentiell waren, wurde der Dialdehyd (**10**) mit LiAlH₄ zu Dictyodiol (**18**) reduziert (siehe 2.8.1). Das Reduktionsprodukt wurde als Dictyodiol (**18**) durch ¹H-NMR-Spektroskopie und MS identifiziert.²⁰⁴

3.2.4.1 Biologische Aktivitäten von *Dictyota volubilis*

In Agar-Diffusions-Tests wurden antifungale Aktivitäten des Dolabellans (**12**) gegen *E. repens* (50 µg/2 mm WH) und *M. microspora* (50 µg/2 mm TH) festgestellt. Dictyol C (**17**) war schwach wirksam gegen *B. megaterium* (50 µg/1 mm WH), *U. violacea* (50 µg/1 mm WH) und *M. microspora* (50 µg/1 mm WH). Acetoxycrenulid (**15**) hemmte das Wachstum von *U. violacea* (50 µg/2 mm TH). Die antimikrobiellen Eigenschaften der Dialdehyde Dictyodial (**10**) und Hydroxydictyodial (**13**) konnten wegen der Instabilität der Substanzen nicht evaluiert werden.

Tabelle 22: HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Hemmung durch Dictyodial (**10**)^a

Substanz	RT-Hemmung	Konzentration	PTK-Hemmung	Konzentration
Dictyodial (10)	11 ^b	200 µg/ml (660 µM)	11 ^b	200 µg/ml (660µM)
	16 ^b	133 µg/ml (440 µM)		
	n. a. ^b	67 µg/ml (220 µM)		

^a HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Test (siehe 2.4.1 bzw. 2.4.2), Enzymrestaktivität in %, n. a. = nicht aktiv (Enzymrestaktivität > 80%); ^b Mittelwert (n = 2)

Alle Reinstoffe außer Hydroxydictyodial (**13**) wurden in HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Tests untersucht. Dictyodial (**10**) hemmte beide Enzyme zu ca. 90% bei Konzentrationen von 660 µM, die Hemmung der HIV-1-RT wurde durch Verdünnungsreihen untersucht (Tabelle 22). Während HIV-1-RT durch Konzentrationen von 200 und 133 µg/ml mit vergleichbarer Stärke inhibiert wurde, war die Substanz bei 67 µg/ml inaktiv. Die isolierten Verbindungen **11**, **12**, **14** - **17** waren im Enzymhemmtest inaktiv. Reduktion von Dictyodial (**10**) ergab Dictyodiol (**18**), welches keines der beiden Enzyme hemmte, und eine auf der Dialdehydstruktur beruhenden Wirkung von Dictyodial (**10**) vermuten ließ.

Dictyodial (10): hellgelbes Öl (120 mg, 0,04%); ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 200 MHz) entsprechend der Literatur.¹⁹⁴

Dictyotalid B (11): gelbliches Öl (9 mg, 0,003%); [α]_D +16,3° (c 0,0062, CHCl₃), (Lit. [α]_D +50,3° (CHCl₃)); ¹H-NMR- (CDCl₃, 300 MHz) und ¹³C-NMR-Spektren (CDCl₃, 75,5 MHz) entsprechend der Literatur.¹⁹⁵

10-Acetoxy-18-hydroxy-2,7-dolabelladien (12): hellgelbes Öl (23 mg, 0,008%); [α]_D -73,8° (c 0,0126, CHCl₃), (Lit. [α]_D -101° (CHCl₃))²⁰⁵; ¹H-NMR- (CDCl₃, 400 MHz) und ¹³C-NMR-Spektren (CDCl₃, 100 MHz) entsprechend der Literatur.^{198,205}

4-Hydroxydictyodial (13): gelbes Öl (Zersetzungsprodukte nach 20 Tagen); ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 200 MHz) entsprechend der Literatur.^{199,206}

Dictyol B (14): hellgelbes Öl (25 mg, 0,009%); [α]_D +53° (c 0,0244, CHCl₃), (Lit. [α]_D +73,5° (CHCl₃))²⁰⁰; ¹H-NMR- (CDCl₃, 400 MHz) und ¹³C-NMR-Spektren (CDCl₃, 100 MHz) entsprechend der Literatur.^{200,207}

Acetoxycrenulid (15): farbloses Öl (23 mg, 0,008%); [α]_D +20° (c 0,0201, CHCl₃), (Lit. [α]_D +13° (CHCl₃)); ¹H-NMR- (CDCl₃, 300 MHz) und ¹³C-NMR-Spektren (CDCl₃, 75,5 MHz) entsprechend der Literatur.²⁰¹

Fucosterol (16): weiße kristalline Substanz (140 mg, 0,05%); $[\alpha_D] -27^\circ$ (c 0,0117, CHCl_3), (Lit. $[\alpha]_D -38,4^\circ$ (CHCl_3))²⁰⁸; GC-EIMS entsprechend den Vergleichsdaten für Fucosterol in der Spektrenbibliothek des Institutes für Organische Chemie, TU Braunschweig sowie das ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 200 MHz) entsprechend der Literatur.^{202,208}

Dictyol C (17): hellgelbes Öl (4 mg, 0,001%); $[\alpha_D] -2,4^\circ$ (c 0,0023, CHCl_3), (Lit. $[\alpha]_D -16,6^\circ$ (CHCl_3)); ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 300 MHz) entsprechend der Literatur.²⁰³

Dictyodiol (18): farbloses Öl (30 mg); $[\alpha_D] -77,5^\circ$ (c 0,0058, CHCl_3); ^1H -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 300 MHz) und EIMS-Analyse entsprechend der Literatur.²⁰⁴

3.2.5 *Ulocladium botrytis* und *Epicoccum* sp.

Aus marinen Makroorganismen können Sekundärstoffe oft nur in Milligrammmengen isoliert werden. Die Gewinnung von Substanzmengen, die für die biologische und pharmazeutische Evaluierung erforderlich sind, hängt von der Verfügbarkeit des Organismus im Feld oder der möglichen Synthese der Naturstoffe ab. Mit kultivierbaren Mikroorganismen als Naturstofflieferanten können einmal identifizierte Verbindungen in ausreichender Menge gewonnen werden. Vor allem das große Potential von antimikrobiell aktiven oder zytotoxischen Metaboliten aus marinen Bakterien und Pilzen konnte gezeigt werden.^{209,210}

Die in dieser Arbeit untersuchten marinen Pilze, deren Extrakte HIV-1-RT oder die PTK p56^{lck} inhibierten, wurden bereits unter 3.1.1 beschrieben. *Ulocladium botrytis* wurde wegen der Hemmung der PTK p56^{lck} schon von Höller *et al.* untersucht und der PTKI Ulocladol (**19**) isoliert.¹³⁷ Die Hemmung von HIV-1-RT konnte durch Ulocladol (**19**) nicht erklärt werden, deshalb wurde *U. botrytis* nochmals kultiviert und bei der Aufarbeitung die Hemmung von HIV-1-RT in Enzymhemmtests verfolgt. Ein weiterer Pilz, *Epicoccum* sp., wurde zum einen wegen der starken Hemmung der PTK p56^{lck}, zum anderen aufgrund nur weniger bisher in der Literatur beschriebener Substanzen hier ausführlich analysiert. Aus *Epicoccum nigrum* wurden bereits die antibiotisch aktiven Epicorazine A und B beschrieben,²¹¹ aus *Epicoccum purpurascens* wurde das Eisentransportmolekül Triornicin mit einer schwachen antitumoralen Wirksamkeit isoliert.²¹²

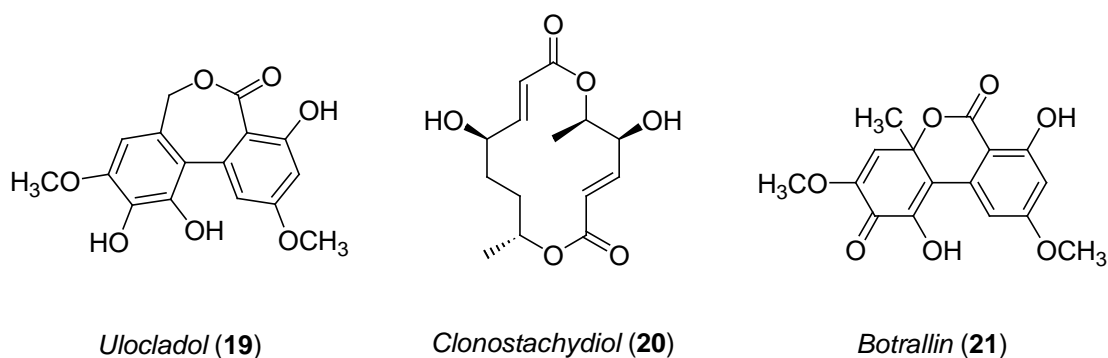
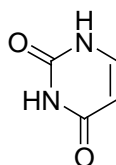


Abbildung 13: Strukturformeln der aus *Ulocladium botrytis* isolierten Substanzen

Der Extrakt von *U. botrytis* hemmte die HIV-1-RT-Aktivität schwach (54% Enzymrestaktivität, siehe 2.4.1). Die chromatographische Aufarbeitung wurde durch den HIV-1-RT, den p56^{lck}-Test und ¹H-NMR-spektroskopisch verfolgt (siehe 3.2.5.2). Dabei wurden der PTKI Ulocladol (**19**)¹³⁷, der schwach wirksame RTI Clonostachydiol (**20**)^{213,214} und Botrallin (**21**)^{215,216} isoliert (Abbildung 13). Die isolierten Verbindungen **19** - **21** wurden mit Hilfe der ¹H-

und ^{13}C -NMR-Spektroskopie und MS durch Vergleich mit Literaturdaten identifiziert (siehe S. 77).

Der zweite hier untersuchte Pilzextrakt aus *Epicoccum* sp. hemmte die Aktivität der PTK p56^{lck} stark. Die Fraktionierung mittels VLC und HPLC wurde durch den PTK-Enzymhemmtest und durch ^1H -NMR kontrolliert (siehe 3.2.5.2). Obwohl die Fraktionen PTK-hemmende Wirkung zeigten, konnten wegen der komplexen Zusammensetzung und sehr geringer Substanzmengen keine Inhibitoren identifiziert werden. In einer dieser Fraktionen wurden geringe Mengen Uracil (**22**) durch ^1H -NMR und MS nachgewiesen (siehe S. 77).



Uracil (**22**)

Abbildung 14: Strukturformel der aus *Epicoccum* sp. identifizierten Verbindung

3.2.5.1 Biologische Aktivitäten von *Ulocladium botrytis* und *Epicoccum* sp.

Ulocladol (**19**) wurde bereits in Agar-Diffusions-Tests, HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Enzymhemmtests untersucht und als PTKI identifiziert (7% Enzymrestaktivität bei 63 μM).¹³⁷ In antiviralen Tests gegenüber HAV in FRhK-Zellen zeigte **19** keine Wirkungen. Clonostachydiol (**20**) und Botrallin (**21**) zeigten in Agar-Diffusions-Tests schwache antifungale Aktivität gegenüber *U. violacea* (jeweils 50 $\mu\text{g}/1\text{ mm WH}$). Im HIV-1-RT-Test wirkte Clonostachydiol (**20**) nur schwach (65% Enzymrestaktivität bei 232 μM).

3.2.5.2 Biotest geführte Fraktionierung der Extrakte von *Ulocladium botrytis* und *Epicoccum* sp.

Der EtOAc-Extrakt und die bei der chromatographischen Bearbeitung (siehe 2.3.2) erhaltenen Fraktionen von *U. botrytis* wurden in den Enzymhemmtests untersucht. Fraktionen mit Hemmwirkung auf HIV-1-RT zeigten diese meist auch im PTK-p56^{lck}-Test. Mit ^1H -NMR wurde gefunden, dass in den VLC-Fraktionen 5, 7 und 8 die gleichen Strukturelemente wie in Fraktion 6 enthalten waren. Wegen der im Vergleich zu den weiteren VLC-Fraktionen stärksten Enzymhemmaktivität in beiden Tests und der größeren Menge wurde mit Fraktion 6 weitergearbeitet. Die hierbei erhaltenen VLC-Fraktionen 6.1 und 6.8 wurden nach ^1H -NMR-Untersuchungen und aufgrund schwächerer Aktivität in den Enzymhemmtests von der weite-

ren Bearbeitung ausgeschlossen. Von den nach HPLC erhaltenen Reinsubstanzen war Clonostachydiol (**20**) im HIV-1-RT- schwach und im PTK-Test nicht aktiv (siehe Abbildung 15 und weiter oben, 3.2.5.1). Ulocladol (**19**) und Botrallin (**21**) wurden ebenfalls isoliert (siehe oben, 3.2.5.1). Weitere HPLC-Fractionen (6.4+5.3, 6.7.1-12.2 und 6.7.1-12.3) hemmten in den Enzymtests die PTK p56^{lck}, ihre Inhaltsstoffe konnten wegen der geringen Menge und Instabilitäten strukturell nicht charakterisiert werden.

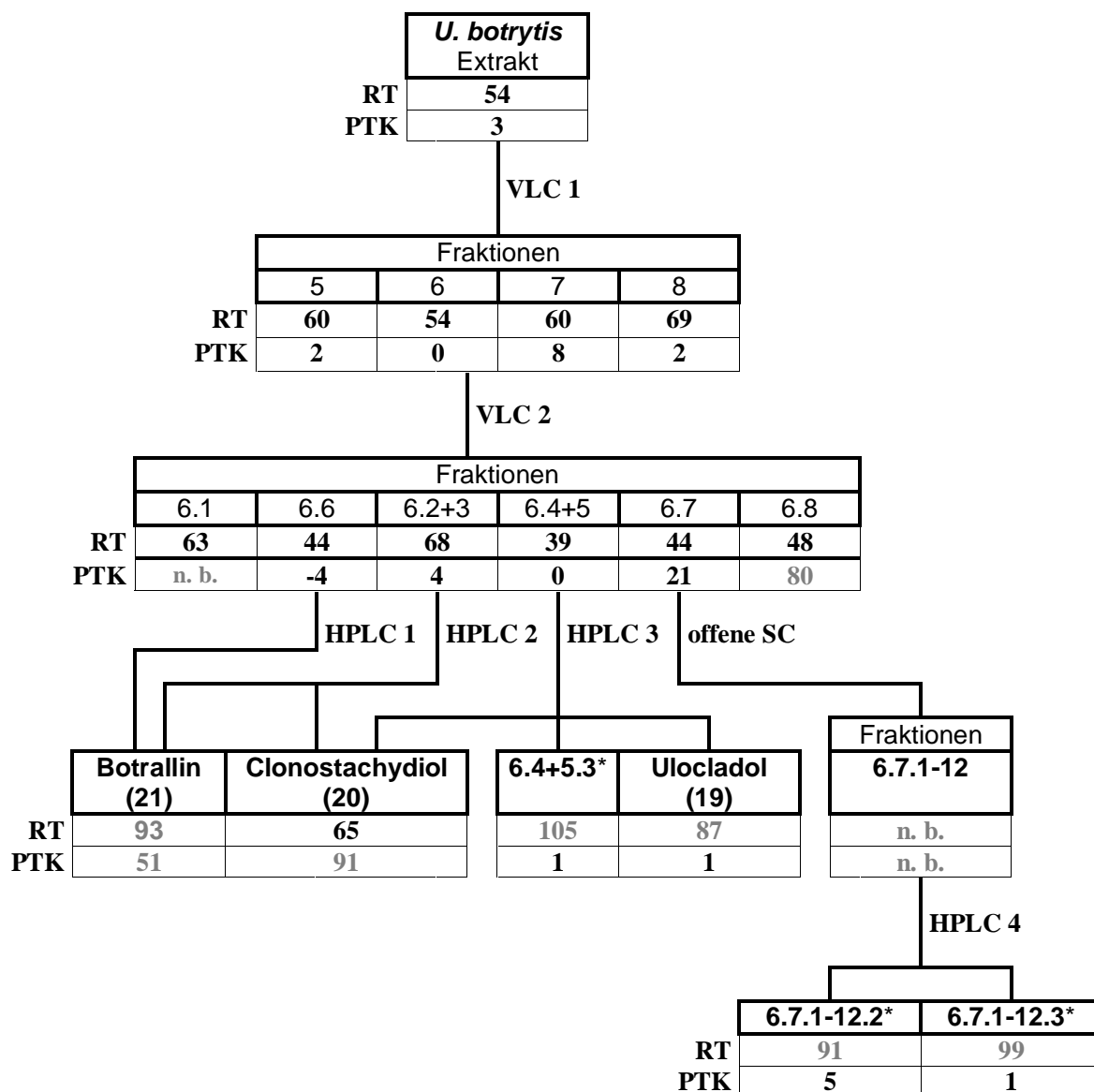


Abbildung 15: Fraktionierungsschema des Extraktes von *U. botrytis*
 = nicht identifizierte Verbindungen, n. b. = nicht bestimmt, Details der Aufarbeitung: siehe 2.3.2

RT = Angabe der Enzymrestaktivität in %, siehe 2.4.1

PTK = Angabe der Enzymrestaktivität in %, siehe 2.4.2

Der Extrakt von *Epicoccum* sp. hemmte die Aktivität der PTK p56^{lck} stark und selektiv. Durch VLC-Fraktionierung, Bestimmen der Enzymhemmaktivität und ¹H-NMR wurden 5 Fraktionen (5-9) zur weiteren Aufreinigung ausgewählt (siehe Abbildung 16). Fraktionen 5, 6,

und die vereinigten Fraktionen 7-9 wurden durch RP-HPLC (Fraktionen 5 und 6) bzw. RP-VLC (Fraktion 7-9) getrennt. Die HPLC-Fraktionierungen ergaben sehr kleine Mengen (≤ 3 mg) von Substanzgemischen. Aus den im PTK-Test stark aktiven Substanzgemischen (Fraktionen 5.1, 5.1.1, 5.A, 6.1, 6.1.1, 6.A, siehe Abbildung 16) konnte nur Uracil (**22**) isoliert werden. Nach der RP-VLC-Fraktionierung von 7-9 reichten die Mengen von 7-9.2 und 7-9.5 für die nochmalige HPLC und nachfolgende Charakterisierung der Inhaltsstoffe jedoch nicht aus. $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie der Substanzgemische und der p56^{lck} -PTK-Test zeigten potentielle PTKI an.

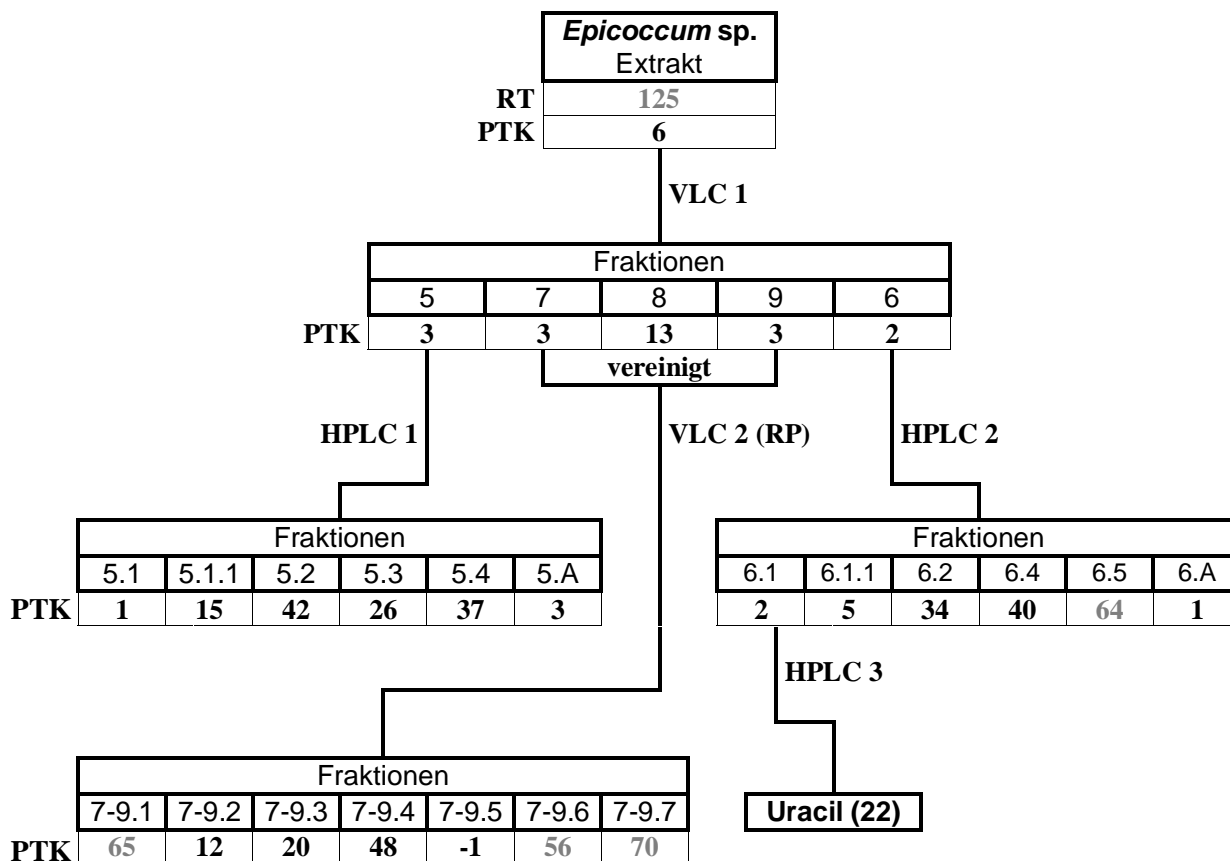


Abbildung 16: Fraktionierungsschema des Extraktes von *Epicoccum* sp.

Details der Aufarbeitung: siehe 2.3.2

RT = Angabe der Enzymrestaktivität in %, siehe 2.4.1

PTK = Angabe der Enzymrestaktivität in %, siehe 2.4.2

Ulocladol (19): weiße Substanz (9 mg); $^1\text{H-NMR}$ - (CDCl_3 , 200 MHz) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren (CDCl_3 , 75,5 MHz), EIMS und Smp. entsprechend der Literatur.¹³⁷

Clonostachydiol (20): farblose Kristalle (30 mg); $[\alpha_D] +92^\circ$ (c 0,0143, MeOH), (Lit. $[\alpha_D] +103^\circ$ (MeOH))²¹³; CIMS (NH_3) m/z 302 $[\text{M}^+ + \text{NH}_4]$ (100); $^1\text{H-NMR}$ - (CD_3OD , 400 MHz) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren (CD_3OD , 100 MHz) entsprechend der Literatur.²¹³

Botrallin (21): gelbe Substanz (9 mg); $[\alpha_D] 0^\circ$ (c 0,0021, MeOH); EIMS m/z 318 $[\text{M}^+]$ (57), 302 (100), 276 (33), 274 (53), 243 (23), 231 (37), 229 (20), 203 (24), 201 (20), 175 (15); $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum entsprechend der Literatur.^{215,216}

Uracil (22): farbloses Öl (3 mg); EIMS m/z 112 $[\text{M}^+]$ (100), 69 (61) und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (CD_3OD , 300 MHz) entsprechend der Literatur.^{189,217}

3.2.6 *Lobophytum crassum*

Viele der für Weichkorallen charakteristischen Sekundärstoffe stammen aus dem Terpenstoffwechsel. Es sind vor allem Sesqui- und Diterpene vom Eudesman- und Cembran-Typ, von denen einige biologische Aktivitäten mit pharmazeutischer Bedeutung besitzen.²¹⁸ Anti-inflammatorische, antibakterielle und neuromuskuläre Aktivitäten von Terpenen aus Weichkorallen wurden von Krebs beschrieben.²¹⁸ Gegenüber kultivierten Krebszelllinien besaß ein Teil der untersuchten Cembrane Toxizität.²¹⁹ So zeigte ein Cembran aus *Sinularia* sp. (Familie: Alcyoniidae) selektive zytotoxische Effekte an einer Reihe von verschiedenen Zelllinien.²²⁰ Ras-Farnesyl-Transferase, eine Zielstruktur für neuartige Krebstherapeutika, wurde von einem Cembran aus *Lobophytum cristagalli* (Familie: Alcyoniidae) gehemmt.²²¹ Diese Beispiele verdeutlichen, dass in Weichkorallen aus der Familie Alcyoniidae Sekundärstoffe mit biomedizinischer Bedeutung vorkommen.

Der CH_2Cl_2 -Extrakt von *Lobophytum crassum* Von Marenzeller 1886 (Familie: Alcyoniidae) wurde durch VLC fraktioniert. Der Nachweis von terpenoiden Inhaltstoffen gelang mittels $^1\text{H-NMR}$. Die den terpenhaltigen Fraktionen wurden durch Normalphasen-HPLC drei bis dahin nicht beschriebene diterpenoide Naturstoffe, ein Cembranester (**23**) und die Eudesmanderivate **24** und **25**, sowie strukturell bekannte Verbindungen wie das Eudesmanderivat (**26**) und 2S,7S,8S-Sarcophytoxid (**27**) isoliert.^{222,223}

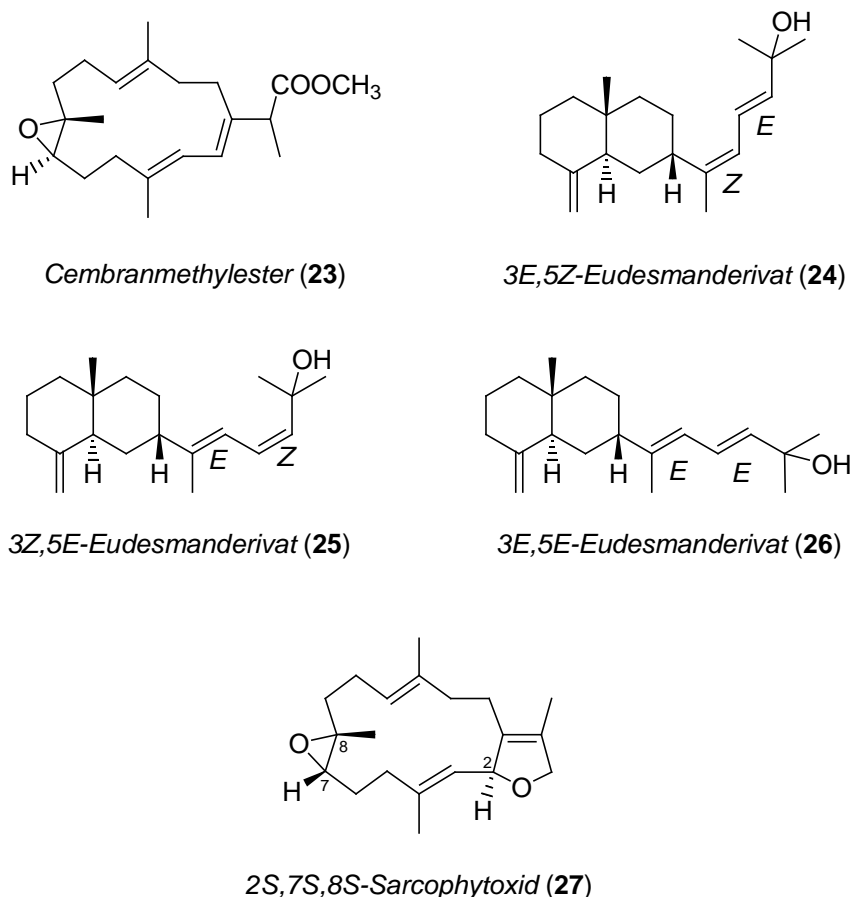


Abbildung 17: Strukturformeln der aus *Lobophytum crassum* isolierten Verbindungen

Die Summenformel des Cembranmethylesters (**23**), $C_{21}H_{32}O_3$, wurde massenspektrometrisch ermittelt. Signifikante Fragmentationen bei m/z 300 $[M-CH_3OH]^+$ und 272 $[M-C_2H_4O_2]^+$ deuteten auf eine Methylesterfunktion hin. Beweis hierfür wurde durch für Methylestergruppen charakteristische Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum für C-16 (δ 175,3 (s)) und C-21 (δ 51,8 (q)) erhalten. UV- und IR-Spektren zeigten die typischen Absorptionsbanden für konjugierte C-C-Doppelbindungen (λ_{max} 256 nm, $\log \epsilon$ 4,2) bzw. für eine Esterfunktion (ν_{max} 1735 cm^{-1}). Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum für jeweils drei vollständig substituierte olefinische C-Atome und für olefinische CH-Atome (Tabelle 24) und die 1H -NMR-Daten (Tabelle 23) zeigten, dass **23** drei trisubstituierte Doppelbindungen besaß. Diese und die Carbonylfunktion waren die einzigen Mehrfachbindungen im bizyklischen Molekül. Als weitere funktionelle Gruppe im Molekül wurde von $\delta(^{13}C)$ von C-7 und C-8 eine sauerstoffhaltige Gruppe, wahrscheinlich ein Epoxidring, abgeleitet. Im 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum von **23** wurden Resonanzen für vier Methylgruppen beobachtet (Tabelle 23, Tabelle 24). Im 1H -NMR-Spektrum konnten die Resonanzen für H-7 einer Epoxyfunktion und für H-15 einer an einer Esterfunktion gebundenen Methingruppe in allylischer Position zugeordnet werden (Tabelle 23). Durch ein $^1H,^{13}C$ -HMQC-Spektrum wurden alle Protonenresonanzen den Resonanzen der direkt

gebundenen C-Atome zugeordnet. Zusammen mit einem $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY wurden so 2 Substrukturen des Moleküls abgeleitet. Ein Fragment des Moleküls von C-13 bis C-7 und ein weiteres Fragment von C-9 bis C-12 inklusive der Methylgruppe C-20 wurde durch die in Abbildung 18 a graphisch dargestellten und in Tabelle 23 quantitativ wiedergegebenen $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY Signale erhalten. Durch $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Korrelationen im HMBC-Spektrum wurden weitere Fragmente von **23** abgeleitet, was in Abbildung 18 b und Tabelle 24 wiedergegeben wurde. Diese bewiesen die Verbindung der durch das $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY abgeleiteten Strukturelemente zwischen C-7 und C-9 wie auch zwischen C-12 und C-13. Die Position der C-20-Methylgruppe an C-8 und der Esterfunktion (C-16, C-21) an C-15 konnte ebenfalls durch $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -Fernkopplungen abgeleitet werden (Abbildung 18 b, Tabelle 24). Durch Superposition der aus den $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY- und $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektren erhaltenen Strukturelemente wird die Aufklärung der Struktur von **23** graphisch dargestellt (Abbildung 18 c). Die *E*-Konfiguration der $\Delta^{1,2}$ -, $\Delta^{3,4}$ - und $\Delta^{11,12}$ -Doppelbindungen von **23** wurde durch Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit Literaturwerten etabliert und durch NOE-Differenz-Messungen bestätigt.²²⁴ Durch NOE-Differenzspektroskopie konnte auch die relative Konfiguration von **23** an C-7 und C-8 bestimmt werden (Abbildung 18 c). Durch Einstrahlung bei δ 5,06 (H-11) wurden die Signale von H-3, H₂-5, H-7, H₂-10 und H₂-14 verstärkt. Verstärkung der Signale von H-3 und H₂-5 wurde nach Einstrahlung bei δ 2,82 (H-7) beobachtet. Am Dreiding-Modell des Cembranmethylester (**23**) konnte gezeigt werden, dass diese NOE-Wechselwirkungen nur bei relativer *trans*-Konfiguration am Epoxidring möglich waren. Die Bestimmung der absoluten Stereochemie war nicht möglich.

Die Weichkoralle enthielt ein weiteres Diterpen mit Cembran-Gerüst, das durch Vergleich von ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Daten und der spezifischen Drehung mit Literaturdaten als 2*S*,7*S*,8*S*-Sarcophytoxid (**27**) identifiziert wurde. Die drei weiteren aus *Lobophytum crassum* isolierten Naturstoffe (**24** - **26**) besaßen ein Eudesman-Grundgerüst. Verbindung **26** wurde anhand der ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Daten und der spezifischen Drehung als 3*E*,5*E*-2-Methyl-6-[4*a'*-methyl-8'-methylen-*trans*-perhydronaphthalen-2'-yl]-hepta-3,5-dien-2-ol identifiziert.

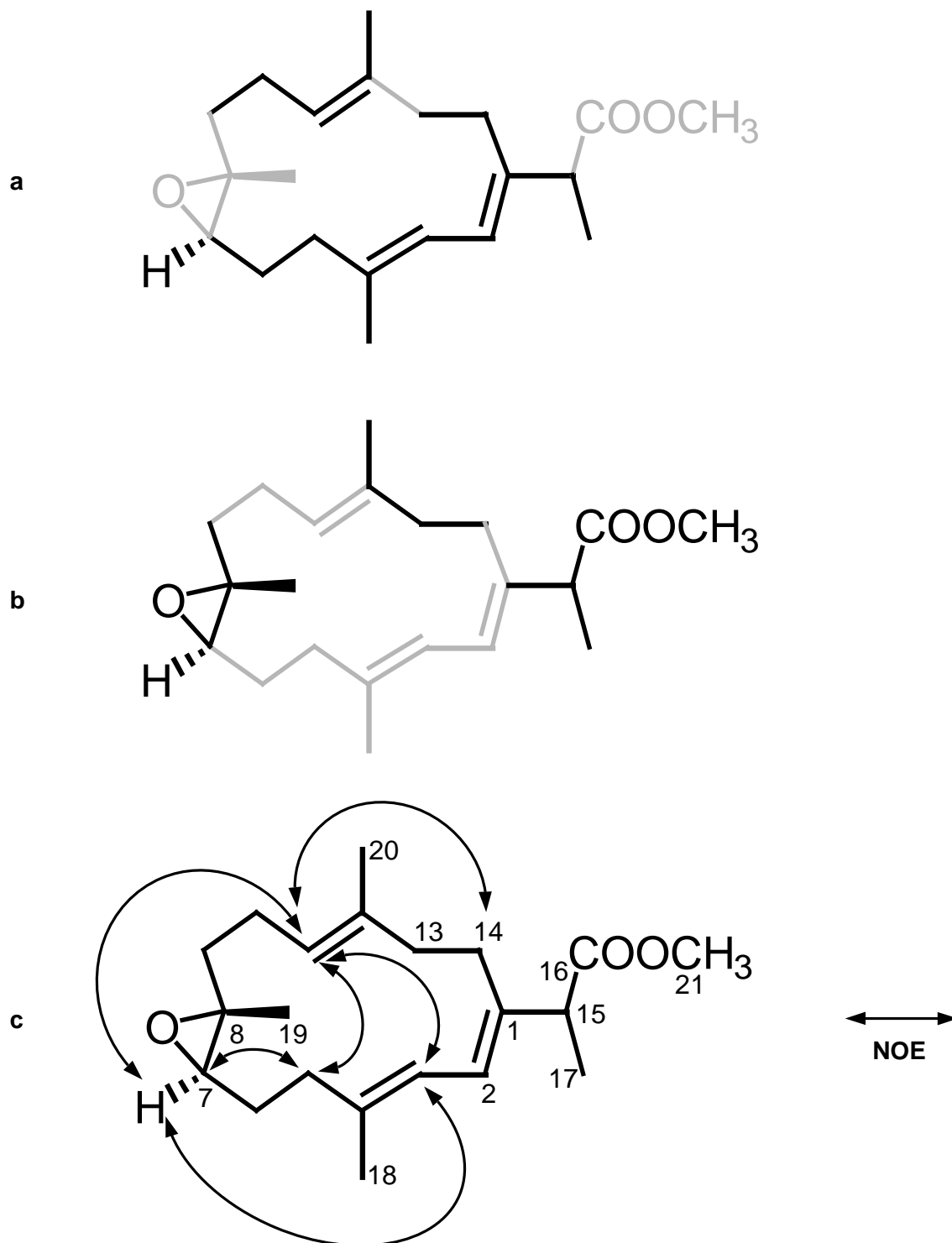


Abbildung 18: Strukturelemente abgeleitet aus NMR-Daten von **23**

a: Strukturelemente basierend auf $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum

b: Strukturelemente basierend auf $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC-Spektrum

c: Superposition der Strukturelemente und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -NOE-Wechselwirkungen

Die Summenformeln der Eudesmanderivate **24** und **25**, $C_{20}H_{32}O$, wurde durch Massenspektrometrie bestimmt. **24** und **25** besaßen die gleichen signifikanten Fragmentationen (m/z 288 $[M^+]$, 273, 270, 255, 189, 161, 147), in UV- ($\lambda_{max}=241$ (**24**) und 243 nm (**25**)) und IR-Spektren (ν 3400 (**24**) und 3415 (**25**), 2925, 1455, 1375 cm^{-1}) die gleichen Absorptionsbanden, sowie mit Ausnahme der unten beschriebenen Unterschiede identische 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren. Eine genaue Analyse dieser spektroskopischen Daten im Vergleich mit **26** ergab, dass **24** und **25** Stereoisomere des Eudesmanderivates **26** waren.

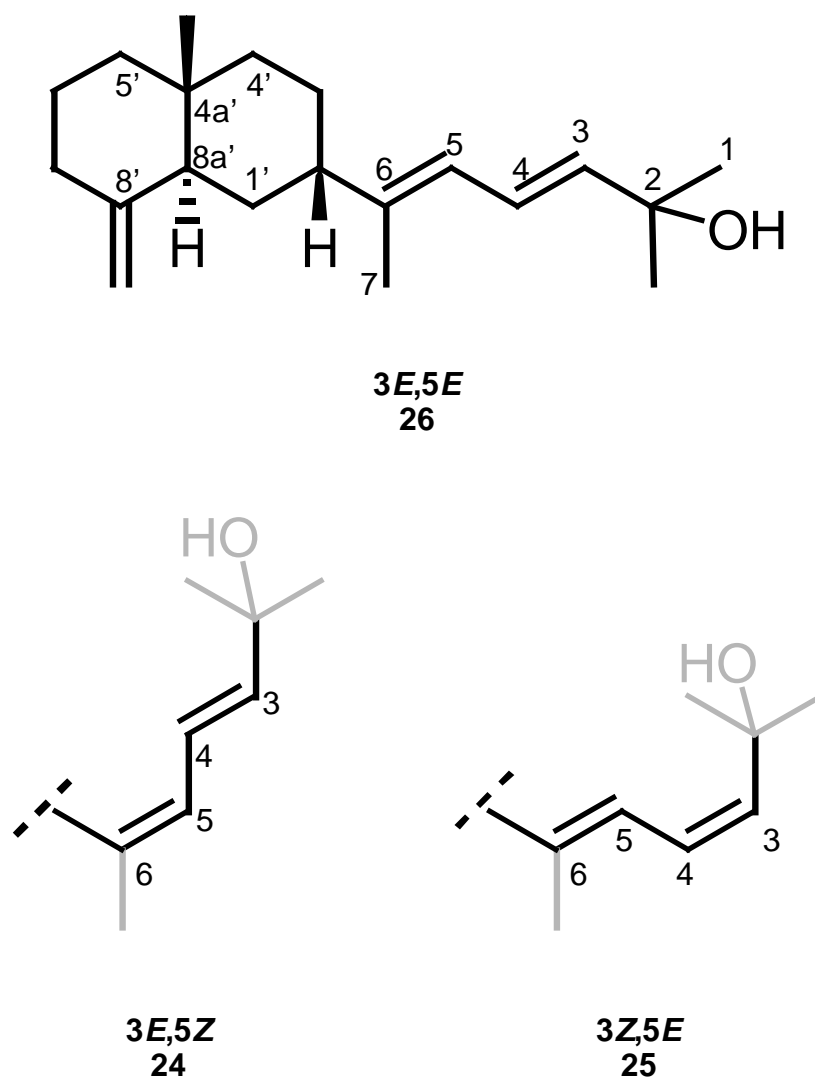


Abbildung 19: Doppelbindungskonfiguration der Eudesmanderivate **24** - **26**

Alle drei Verbindungen unterschieden sich nur in der $\Delta^{3,4}$ - und $\Delta^{5,6}$ -Doppelbindungskonfiguration, was Signale im 1H -NMR-Spektrum zwischen δ 5,4 und δ 6,8 zeigten. Durch Bestimmung der $^3J_{H-3,H-4}$ -Kopplungskonstante wurde die $\Delta^{3,4}$ - und der $\delta(^{13}C)$ der C-7-Methylgruppe die $\Delta^{5,6}$ -Doppelbindungsgeometrie festgelegt (Abbildung 19).¹⁶⁸ Bei Verbindung **24** mit $^3J_{H-3,H-4} = 15,1$ Hz und $\delta(^{13}C)$ für C-7 von 24,8 lag das 3E,5Z-Isomer vor.

Verbindung **25** mit $^3J_{\text{H-3,H-4}} = 11,7$ Hz und $\delta(^{13}\text{C})$ für C-7 von 16,0 besaß 3Z,5Z-Konfiguration. Als Vergleich diente das als 3E,5E-Isomer bereits beschriebene Eudesmanderivat **26** mit $^3J_{\text{H-3,H-4}} = 15,3$ Hz und $\delta(^{13}\text{C})$ für C-7 von 16,7.

Die Verbindungen **24** - **26** waren sehr instabil. Die nach Abspaltung von H_2O anschließend mögliche Polymerisation der Substanzen wurde für das Eudesman **26** bereits beschrieben.²²³

3.2.6.1 Biologische Aktivitäten von *Lobophytum crassum*

In Agar-Diffusions-Tests hemmten der CH_2Cl_2 - und MeOH-Extrakt von *Lobophytum crassum* das Wachstum von *E. coli* und *B. megaterium*. Die antibakterielle Wirkung der Extrakte konnte keinem Reinstoff zugeordnet werden. 2S,7S,8S-Sarcophytoxid (**27**) hemmte das Wachstum der Mikroalge *C. fusca* (50 $\mu\text{g}/3$ mm WH) und von *U. violacea* (50 $\mu\text{g}/3$ mm WH), der Cembranmethylester (**23**) besaß schwache antifungale Aktivität gegen *U. violacea* (50 $\mu\text{g}/1$ mm WH). In Enzymhemmtests gegen p56^{lck} -PTK oder HIV-1-RT waren die Extrakte und Reinsubstanzen **23** und **27** inaktiv. In Tests gegenüber HAV in FRhK-Zellen zeigte **27** keine Wirkung. Die Verbindungen **24-26** entzogen sich wegen ihrer Instabilität biologischen Tests.

Cembranmethylester (23): klares Öl (10 mg, 0,007%): $[\alpha]_{\text{D}} +56^\circ$ (c 0,008, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 256 nm (4,2); IR (Film) ν_{max} 2925, 1735, 1450, 1435, 1240, 1195, 1170, 845 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) siehe Tabelle 23; $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3) siehe Tabelle 24; EIMS m/z 332 [M^+] (12), 300 (4), 272 (4), 245 (12), 121 (100); HREIMS m/z 332,2365 (berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$: 332,2352).

3E,5Z-Eudesmanderivat (24) (3E,5Z-2-methyl-6-[4a'-methyl-8'-methylene-trans-perhydronaphthalen-2'-yl]-hepta-3,5-dien-2-ol): klares Öl (10 mg, 0,007%): $[\alpha]_{\text{D}} +51^\circ$ (c 0,00041, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 241 nm (4,5); IR (Film) ν_{max} 3400, 2925, 1455, 1375, 1235 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) siehe Tabelle 23; $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3) siehe Tabelle 24; EIMS m/z 288 [M^+] (45), 273 (5), 270 (17), 255 (16), 189 (92), 162 (100), 161 (26), 147 (70), 123 (68); HREIMS m/z 288,245 (berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}$: 288,2453).

3Z,5E-Eudesmanderivat (25) (3Z,5E-2-methyl-6-[4a'-methyl-8'-methylene-trans-perhydronaphthalen-2'-yl]-hepta-3,5-dien-2-ol): klares Öl (15 mg, 0,01%): $[\alpha]_{\text{D}} +70^\circ$ (c 0,0014, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ) 243 nm (4,1); IR (film) ν_{max} 3415, 2925, 1645, 1440, 1375, 1150 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) siehe Tabelle 23; $^{13}\text{C-NMR}$ (75,5 MHz, CDCl_3) siehe Tabelle 24; EIMS m/z 288 [M^+] (12), 273

(3), 270 (17), 255 (9), 189 (18), 173 (8), 161 (19), 147 (17), 125 (100); HREIMS m/z 288,2448 (berechnet für $C_{20}H_{32}O$: 288,2453).

3E,5E-Eudesmanderivat (26) (3E,5E-2-methyl-6-[4a'-methyl-8'-methylen-trans-perhydronaphthalen-2'-yl]-hepta-3,5-dien-2-ol): klares Öl (>100 mg, 0,07%): $[\alpha]_D +102^\circ$ (c 0,009, $CHCl_3$); alle weiteren Daten entsprechend der Literatur.²²³

2S,7S,8S-(+)-Sarcophytoxid (27): weiße Nadeln (350 mg, 0,23%): Smp. $83^\circ C$ (Lit.: $79-81^\circ C$)²²⁵; $[\alpha]_D -172^\circ$ (c 0,003, $CHCl_3$) (Lit. $[\alpha]_D -191^\circ$ (c 0,4, $CHCl_3$))²²⁵; alle weiteren Daten entsprechend der Literatur.²²²

Tabelle 23: 1H -NMR-Daten (300 MHz, $CDCl_3$) von **23-25**

Proton	Cembranmethyl- ester (23) $\delta(^1H)$	Cembranmethyl- ester (23) $^1H, ^1H$ -COSY ^a	Proton	3E,5Z- Eudesmanderi- vat (24) ^b	3Z,5E- Eudesmanderivat (25)
2	6,19 (d, $J = 10,9$ Hz)	H-3, H-14, H-15	1	1,33 (s)	1,43 (s)
3	5,96 (dq, $J = 1,2, 10,9$ Hz)	H-2, H-5, H-18	3	5,70 (d, $J = 15,1$ Hz)	5,49 (d, $J = 11,7$ Hz)
5	2,25 (m)	H-3, H-6	4	6,45 (dd, $J = 10,9, 15,1$ Hz)	6,21 (dd, $J = 11,7, 11,7$ Hz)
6	1,75 (m)	H-5, H-7	5	5,74 (d, $J = 10,9$ Hz)	6,74 (d, $J = 11,7$ Hz)
7	2,82 (dd, $J = 5,3, 5,7$ Hz)	H-6	7	1,94 (s)	1,74 (s)
9	1,91 (m) 1,57 (m)	H-10	1'	*	1,82 (m) 1,60 (m)
10	2,01 (m)	H-9, H-11	2'	3,17 (m)	2,47 (m)
11	5,06 (brdd, $J = 6,4, 6,4$ Hz)	H-10, H-20	3'	*	1,83 (m)
13	2,23 (m) 1,99 (m)	H-14	4'	*	1,45 (m) 1,25 (m)
14	2,33 (m)	H-2, H-13	5'	*	1,39 (m)
15	3,20 (q, $J = 7,2$ Hz)	H-2, H-17			1,23 (m)
17	1,31 (d, $J = 7,2$ Hz)	H-15	6'	*	1,58 (m)
18	1,77 (s)	H-3	7'	2,29 (m)	2,28 (m)
19	1,26 (s)			2,00 (m)	1,96 (m)
20	1,58 (s)	H-11	8a'	*	1,89 (m)
21	3,65 (s)		2-CH₃	1,33 (s)	1,43 (s)
			4a'-CH₃	0,75 (s)	0,78 (s)
			8'-CH₂	4,71 (d, $J = 1,5$ Hz) 4,41 (d, $J = 1,5$ Hz)	4,70 (d, $J = 1,6$ Hz) 4,43 (d, $J = 1,6$ Hz)

^a Für die Strukturaufklärung relevante Kopplungen; ^b Zuordnung basiert auf $^1H, ^1H$ -COSY und Vergleich der Daten von **25** und **26**; * Resonanzen zwischen δ 1,0-1,9. Zuordnung nicht möglich, da Substanz vor dem HMQC-Experiment zersetzt war.

Tabelle 24: ^{13}C -NMR-Daten (75,5 MHz, CDCl_3) für **23-25**

C-Atom	Cembranmethylester (23) $\delta(^{13}\text{C})$	Cembranmethylester (23) $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC ^a	C-Atom	3E,5Z-Eudesman-derivat (24) ^b	3Z,5E-Eudesman-derivat (25)
1	139,7 s	H-15, H-17	1	29,9 q	31,4 q
2	122,9 d		2	71,0 s	71,8 s
3	121,0 d		3	139,3 d	135,8 d
4	136,6 s		4	125,1 d	125,2 d
5	35,9 t		5	122,6 d	120,2 d
6	25,7 t		6	145,0 s	142,0 s
7	61,3 d	H-19	7	24,8 q	16,0 q
8	60,0 s	H-9, H-19	1'	28,9 t*	26,1 t
9	36,9 t	H-19	2'	40,7 d	40,7 d
10	22,3 t		3'	23,5 t*	23,4 t
11	126,1 d		4'	37,2 t*	36,9 t
12	135,3 s	H-13, H-14	4a'	35,5 s	36,4 s
13	38,2 t	H-20	5'	42,6 t	42,3 t
14	29,0 t		6'	24,7 t*	23,5 t
15	46,3 d		7'	38,3 t*	37,1 t
16	175,3 s	H-15, H-17, H-21	8'	150,0 s	151,2 s
17	16,8 q		8a'	45,3 d	44,3 d
18	17,2 q		2-CH ₃	29,9 q	31,4 q
19	18,1 q		4a'-CH ₃	15,9 q	16,0 q
20	17,1 q		8'-CH ₂	105,5 t	105,1 t
21	51,8 q				

Multiplizität durch BB und DEPT, s = C, d = CH, t = CH₂, q = CH₃; ^a Für die Strukturauklärung relevante Kopplungen; ^b Zuordnung durch Vergleich mit Daten von **25** und **26**; * Zuordnung unsicher da Probe vor HMQC-Experiment zersetzt war

4 Diskussion

4.1 Biologische Prüfung von Extrakten und Reinsubstanzen

Trotz großer Fortschritte im Kampf gegen Krebs und Erkrankungen des menschlichen Immunsystems wie AIDS bleiben diese Krankheiten sicherlich auch für die nächsten Jahre große Herausforderungen für Medizin und Pharmazie. Ein erfolgversprechender Ansatzpunkt, der auch in dieser Arbeit verfolgt wurde, stellt die Blockierung von Enzymen dar, die bei diesen Erkrankungen wesentliche Rollen spielen. Im Brennpunkt stehen dabei HIV-1-RT-Inhibitoren gegen AIDS und p56^{lck}-PTK-Inhibitoren als möglicherweise wirksam gegen Leukämien und Autoimmunerkrankungen (siehe 1.3).

In der bisher umfangreichsten Suche nach anti-HIV-wirksamen Naturstoffen am US National Cancer Institute (NCI) wurde die antivirale Aktivität mit HIV-infizierten T-Lymphozyten geprüft. Einige der dabei identifizierten HIV-Hemmstoffe waren Inhibitoren der HIV-1-RT: z. B. Calanolide A und die Michellamine A-C (siehe 1.2.2).^{24,37} In weiteren Screenings wurden der stark wirksame HIV-1-RTI Quinoxapeptin A aus einem Bakterium,⁶⁴ sowie Mniopetal F aus dem Pilz *Mniopetalum* sp. gefunden (siehe 1.2.3).⁷² Marine Organismen wurden ebenfalls gegenüber der HIV-1-RT untersucht. Hierbei besaßen vor allem Sekundärstoffe aus Schwämmen hemmende Eigenschaften (siehe 1.2.4). Es wurden sesquiterpenoide Hydrochinone wie Illimaquinone aber auch Alkaloide, wie Fascaplysin und Plakanidine A, als HIV-1-RTI erkannt.^{80,86,87}

Als spezifische Hemmstoffe der p56^{lck}-PTK wurden mit in-vitro-Tests insgesamt nur wenige Sekundärstoffe aus Pflanzen und Pilzen identifiziert, wie Damnacanthol aus *Damnacanthus* sp. und 1-Methoxyagroclavine aus *Penicillium* sp. (siehe 1.3.1).^{111,112}

Die in der vorliegenden Untersuchung verfolgte Strategie beruhte auf einem Primär-Screening mit isolierten Enzymen als Zielstrukturen. Die Hemmung durch Extrakte und Reinsubstanzen vorwiegend mariner und mikrobieller Herkunft wurde untersucht. Hierfür wurden HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Enzymhemmtests im Arbeitskreis G. König, TU Braunschweig, neu etabliert. Insgesamt wurden 461 Organismen untersucht; eine im Vergleich mit der Gesamtzahl von in der Natur vorkommenden und bekannten Lebewesen, die analysiert werden könnten, sicherlich gering erscheinende Anzahl. Es kann hier somit nur eine vorläufige Aussage basierend auf der Untersuchung einer relativ kleinen „Stichprobe“ erhalten werden. Ein Beitrag zur Suche nach neuen biologischen Wirkstoffen ist diese Arbeit sicherlich. Die Zahl der Organismen weicht von der Anzahl von ca. 900 getesteten Extrakten ab, da Mikroorga-

nismen vielfach auf unterschiedlichen Nährmedien kultiviert wurden, und oftmals lipophile und auch hydrophile Auszüge eines Organismus hergestellt wurden.

Zur Kontrolle der Enzymreaktion und der Testsysteme wurden bekannte Inhibitoren verwendet (siehe 3.1). Die ersten HIV-1-RT-Tests wurden mit AZT-Triphosphat (0,5 nM) als Kontrollsubstanz durchgeführt. Da AZT-Triphosphat nur in der triphosphorylierten, instabilen Form eingesetzt werden konnte, wurden die späteren Experimente mit dem stabilen Foscarnet kontrolliert (10 µM). Insgesamt konnte durch die Auswertung der Standards gezeigt werden, dass die Enzymrestaktivität auch in verschiedenen Chargen des HIV-1-RT-Tests um nicht mehr als gerundet $\pm 10\%$ schwankte und damit eine sichere Identifizierung von HIV-1-RT-Hemmstoffen möglich war. Inhibitoren sollten also das Enzym mindestens um den doppelten Betrag der größeren Standardabweichung ($\pm 8,46\%$ Enzymrestaktivität, gerundet $\pm 10\%$) hemmen. Daraus wurde der Grenzwert für aktive Proben auf eine Enzymrestaktivität von 80% festgelegt. Entsprechend diesem Kriterium wurden 88,3% der untersuchten Extrakte als inaktiv im HIV-1-RT-Test betrachtet (siehe 3.1.1).

Die vollständige Enzymhemmung im p56^{lck}-PTK-Test durch Piceatannol (3 mM) hatte zur Folge, dass dieser Test nicht durch Berechnung einer Standardabweichung beurteilt werden konnte. Piceatannol 3 mM hemmte die PTK p56^{lck} in der ausgewerteten Stichprobe (n = 42) immer komplett. Bei geringeren Konzentrationen war Piceatannol in Lösung instabil; andere geeignete Referenzsubstanzen waren nicht verfügbar. Der empirisch festgelegte Grenzwert von 50% Enzymrestaktivität führte zum Ausschluss von 86,2% aller getesteter Extrakte, eine Ausschlussrate ähnlich der beim HIV-1-RT-Test ermittelten (88,3%).

Insgesamt wurde an den Standardhemmstoffen AZT-Triphosphat, Foscarnet und Piceatannol gezeigt, dass im HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Test Enzyminhibitoren zuverlässig erkannt werden konnten. Als aktiv eingestufte Extrakte enthielten also mit großer Wahrscheinlichkeit einen oder mehrere Hemmstoffe des Enzyms. Durch die Aufarbeitung ausgewählter Extrakte und die Isolierung von Naturstoffen wurde die durch Analyse dieser Standardhemmstoffe aufgestellte Vermutung bestätigt, dass mit den eingesetzten Testsystemen biologisch aktive Inhaltsstoffe sicher identifiziert werden können (siehe 3.2).

Die Ergebnisse der HIV-1-RT-Tests lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Von den im HIV-1-RT-Test untersuchten 896 Extrakten wurden insgesamt 105 (11,7%) mit Hemmaktivitäten identifiziert (siehe 3.1.1).
- Der Anteil aktiver Extrakte lag bei Pilzisolaten (17%) und Samenpflanzen (26,5%) deutlich höher als bei der Summe der Extrakte.

- Von den untersuchten Algenextrakten waren 13,5% Inhibitoren des Enzyms.
- Kein Bakterienextrakt und nur ein kleiner Teil der Cyanobakterienextrakte (2,9%) hemmten HIV-1-RT.
- Mittlere oder starke Hemmungen von HIV-1-RT wurden von Algen-, Schwamm-, Pilz- und Samenpflanzenextrakten festgestellt (siehe 3.1.1).

Es zeigte sich damit deutlich, dass vor allem diese 4 letztgenannten Organismengruppen (Algen, Schwämme, Pilze und Samenpflanzen) Naturstoffe mit potenten biologischen Aktivitäten in Konzentrationen enthalten, die mit dem HIV-1-RT-Test nachweisbar sind.

Dass diese im HIV-1-RT-Enzymhemmtest aufgefallenen Organismen potentielle Lieferanten von biologisch aktiven Naturstoffen sind, konnte auch durch diese Arbeit bestätigt werden. Aus den Schwämmen *Hyrtios* cf. *erecta* (siehe 3.2.1), *Xestospongia rosariensis* (siehe 3.2.2) und *Amphimedon* sp. (siehe 3.2.3), der Braunalge *Dictyota volubilis* (siehe 3.2.4) sowie aus dem Pilz *Ulocladium botrytis* (siehe 3.2.5) wurden HIV-1-RT-inhibierende Substanzen in verwertbarer Menge isoliert.

681 der 896 im HIV-1-RT-Test untersuchten Extrakte wurden auch gegenüber der PTK p56^{lck} getestet. Im Vergleich mit dem HIV-1-RT-Test stellen sich die Ergebnisse folgendermaßen dar:

- 94 (13,8%) der getesteten Extrakte zeigten Aktivität im p56^{lck}-PTK-Test.
- Von diesen ergab sich vor allem bei Samenpflanzenextrakten eine wesentlich höhere Trefferrate (36,2%).
- Auch bei Algen- (20%) und Schwammextrakten (22%) hemmte eine größere Anzahl die p56^{lck}-PTK.
- Dagegen wiesen Bakterien-, Cyanobakterien- und sonstige marine Makroorganismenextrakte (Bryozoen, Manteltiere, Weichtiere und Nesseltiere) im PTK-Test nur die sehr kleine Trefferrate von 1,5 bis 2,9% der getesteten Extrakte auf.
- Starke Aktivität zeigten Algen-, Schwamm-, Pilz- und Samenpflanzenextrakte, eine Verteilung wie beim HIV-1-RT-Test.

Dies untermauerte die beim HIV-1-RT-Test schon abgeleitete Folgerung, dass vor allem Algen, Schwämme, Pilze und Samenpflanzen biologisch besonders wirkungsvolle

Substanzen, also auch p56^{lck}-PTK-Hemmstoffe, in höheren Konzentrationen akkumulieren als die anderen untersuchten Organismengruppen.

Einer der PTK-hemmenden Pilzextrakte, *Epicoccum* sp. (siehe 3.2.5), wurde ausführlich untersucht. Dessen Potential konnte nicht abschließend beurteilt werden, da von den enzymhemmenden Fraktionen zu geringe Mengen für die Strukturaufklärung der aktiven Inhaltsstoffe vorlagen (siehe 3.2.5.2). Allerdings konnte bei der Untersuchung von Reinsubstanzen aus der AG G. König, TU Braunschweig, gezeigt werden, dass viele aus Pilzen und marinen Organismen gewonnene Substanzen PTK-hemmende Eigenschaften besaßen (siehe 3.1.2).

Aus der großen Anzahl von ca. 900 Extrakten verschiedener Organismen wurde aufgrund von HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Tests eine überschaubare Zahl mit potentiell selektiv wirksamen Enzyminhibitoren ausgewählt. Es konnten 37 Extrakte (4% der im HIV-1-RT-Test untersuchten) identifiziert werden, die nur eines der beiden Enzyme mit mittlerer oder starker Potenz hemmten, also eine gewisse Selektivität zeigten, so dass sie für eine ausführliche Untersuchung in Frage kamen.

Um das Potential der identifizierten Extrakte als Lieferanten von biologisch aktiven Naturstoffen besser einzuschätzen, wurden zusätzlich die nachfolgend beschriebenen Analysen- und Aufarbeitungsschritte eingeführt:

- Physikalisch-chemischen Untersuchungsmethoden, wie DC, NMR und MS, gaben Hinweise auf möglicherweise enthaltenen Sekundärstoffe, ohne jedoch eine Aussage über deren biologische Aktivität zu ermöglichen.
- Vor Beginn der detaillierten Aufarbeitung war die Taxonomie dieses Organismus abgeschlossen, um die wiederholte Isolierung von bereits bekannten Inhibitoren der Enzyme zu vermeiden. Eine Auswahl allein nach Kriterien der Taxonomie wäre ebenfalls denkbar. Jedoch sind taxonomische Studien oft langwierig, so dass die Beurteilung von einer großen Probenmenge erst zeitlich stark verzögert erfolgen könnte.

Zusätzlich können folgende Untersuchungen, die hier ergänzend angeführt werden, als weitere Kriterien zur umfassenden Beurteilung von inhibierenden Extrakten dienen:

- Um auszuschließen, dass „falsch positive“ Inhibitoren wie Gerbstoffe und Glykolipide in den Tests ebenfalls erkannt werden, ist eine chromatographische Reinigung hydrophiler Extrakte vor den Tests möglich, wie von Cardellina II et al. beschrieben.⁹⁶

- Sehr niedrige Konzentrationen von wirksamen Stoffen führen zu einer geringen Enzymhemmaktivität des Extraktes und zu „falsch negativen“ Testergebnissen. Bei nahe am Grenzwert liegender Enzymaktivität können die fraglichen Extrakte daher fraktioniert und mögliche Inhibitoren in höheren Konzentrationen enthaltende Fraktionen nochmals untersucht werden.
- Im Gemisch mit „synergistisch“ wirkenden Verbindungen aktive Inhibitoren können frühestens nach einem ersten Trennungsschritt erkannt werden. Die hierbei erhaltenen Fraktionen erweisen sich dann als inaktiv in den Tests.

Bei der biologischen Prüfung der Reinstoffe aus der Naturstoff-Sammlung der AG G. König, TU Braunschweig, wurden 140 (HIV-1-RT) bzw. 135 (p56^{lck}-PTK) Substanzen bezüglich ihrer Eigenschaften als Enzyminhibitoren untersucht (siehe 2.2, 3.1.2). Dabei wurden 11 als HIV-1-RT-Hemmstoffe und 20 als PTKI identifiziert. Die RTI Halitoxin (**6**) und Clonostachydiol (**20**), die PTKI Isodehydroluffariellolid (**3**), Homofascaplysin A (**4**) und Ulocadlol (**19**) sowie Fascaplysin (**5**) und Dictyodial (**10**), welche beide Enzyme inhibierten, wurden bei der chemischen Untersuchung ausgewählter Organismen isoliert (siehe 3.2, 4.2). Von den übrigen Substanzen hemmten mit Ausnahme von Cochlioquinone B aus dem Pilz *Drechslera dermatioidea* und Delisea 23 aus der Alge *Delisea* sp. alle nur eines der beiden Enzyme und erfüllten somit die vorne aufgestellte Forderung nach „Selektivität“.

Strukturell sind bei den HIV-1-RT-Hemmstoffen keine Gemeinsamkeiten offensichtlich, so dass der Mechanismus der Inhibitoren einzeln untersucht werden müsste. Bisher wurden die Wirkungen der Verbindungen **6** und **10** näher betrachtet. Die Aktivität von Dictyodial (**10**) wurde durch die Aldehydfunktionen verursacht (siehe 3.2.4, 4.2). Halitoxin (**6**) ist oberflächenaktiv und könnte somit durch Denaturierung die Hemmung der HIV-1-RT bewirken (siehe 3.2.2, 4.2).

Bei den p56^{lck}-PTK-Inhibitoren fällt auf, dass einige chinoide und phenolische Struktureile beinhalten (Atomaric Acid, Styloquinonic Acid, Cochlioquinone B, Genistein, Ulocadlol (**19**)). Im reduzierenden Milieu des Puffers für die Enzymreaktion könnten diese Verbindungen als Phenole vorliegen und durch die Ähnlichkeit mit dem Substrat Tyrosin als kompetitive Inhibitoren wirken. Dictyodial (**10**) wirkt vermutlich auch hier als unspezifischer Hemmstoff durch die Aldehydgruppen. Um den Mechanismus der anderen Hemmstoffe aufzuklären, sind weitere Untersuchungen nötig.

Zusammenfassend können zu dem in dieser Arbeit verfolgten Konzept zum Auffinden von Enzyminhibitoren aus verschiedenen Organismen unterschiedlicher biologischer Herkunft mit Hilfe der HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Tests folgende Schlüsse gezogen werden:

- Die eingesetzten HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Tests erwiesen sich als sichere Hilfsmittel, mit denen eine große Anzahl von Extrakten schnell und einfach im chemischen Labor auf Hemmstoffe der jeweiligen Enzyme untersucht werden kann.
- Vor allem bei Beachtung von zusätzlich gewonnenen Daten, beispielsweise durch NMR-Spektroskopie und Taxonomie, können biologisch aktive Naturstoffe so in möglichst kurzer Zeit und mit geringstmöglichem Aufwand in ausreichender Menge zur chemischen und biologischen Charakterisierung isoliert werden.
- Die pharmazeutisch-medizinische Bedeutung der Enzymhemmstoffe muss in weiteren über diese Arbeit hinausgehenden Tests zur Toxizität oder in Zellkulturmodellen evaluiert werden.
- Obwohl die hier untersuchten Reinsubstanzen nur einen kleinen Ausschnitt aus in der Natur vorkommenden Strukturen darstellen, zeigen diese Verbindungen aus marinen Lebewesen und Pilzen, dass Hemmstoffe sowohl der HIV-1-RT als auch der p56^{lck}-PTK von diesen Organismen produziert werden.

4.2 Charakterisierung der untersuchten Organismen

Verbunden mit der Suche nach wirksamen Extrakten mariner Lebewesen oder im Labor kultivierter Pilze (siehe 3.2) stand die strukturchemische und biologische Charakterisierung der enthaltenen inhibierenden Reinstoffe im Mittelpunkt dieser Arbeit. Um die große Zahl Extrakte in einem zeitlich sinnvollen Rahmen zu bearbeiten, wurden nach den folgenden Kriterien erfolversprechende Proben für die weitere Bearbeitung ausgewählt:

- Aktivität in den Enzymhemmtests
- Erkennung von auffälligen Strukturelementen in ^1H -NMR-Spektren
- außergewöhnliche, bislang naturstoffchemisch kaum untersuchte Taxa
- Ökologische Beobachtungen im Habitat

4.2.1 Chemie und Taxonomie

Aus dem Schwamm *Hyrtios* cf. *erecta* wurden zwei bisher unbekannte Sesterterpene (**1**, **2**), ein weiteres Sesterterpen, Isodehydroloffariellolid (**3**), und die Alkaloide Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) isoliert (siehe 3.2.1). Die Verbindungen **3** - **5** wurden bereits aus dem Schwamm *Fascaplysinopsis* sp. beschrieben.^{86,167} Die Gattungen *Hyrtios* und *Fascaplysinopsis* gehören beide der Familie Thorectidae an, so dass identische Sekundärstoffe (**3** - **5**) in *Hyrtios* und *Fascaplysinopsis* die Zugehörigkeit beider zu einer Familie aus chemotaxonomischen Gründen unterstützte. Es ist auch denkbar, dass unsere als *Hyrtios* cf. *erecta* identifizierte Probe und die in der Literatur aufgeführte *Fascaplysinopsis* sp. dieselbe Art darstellen, da die Zuordnung durch verschiedene Taxonomen und ohne direkten Vergleich der Proben erfolgte. Gewissheit hierüber könnte nur durch eine parallele morphologische Analyse beider Proben erhalten werden.

Aus *Xestospongia rosariensis* (Familie: Petrosidae, Ordnung Petrosida) wurde erstmals das N-Alkylpyridin-Oligomer Halitoxin (**6**) isoliert und als HIV-1-RT-Hemmstoff charakterisiert. Ein weiteres N-Alkylpyridin-Oligomer wurde aus einer *Amphimedon* sp. (Familie: Niphatidae, Ordnung Haplosclerida) erhalten (siehe 3.2.3). Bis 1980 gehörten die Familien Niphatidae und Petrosidae zur Ordnung Haplosclerida. Auf Vorschlag von Bergquist wurden

die Haplosclerida in zwei Ordnungen aufgeteilt, die später Haplosclerida und Petrosida genannt wurden.²²⁶ Andere, wie Van Soest, blieben bei der bis dahin gebräuchlichen Zuordnung und es gibt daher Zweideutigkeiten in der Taxonomie der genannten Familien.²²⁷ Niphatidae wie Petrosidae zeichnen sich jedoch durch das Vorkommen von 3-Alkylpyridin-Derivaten aus, was aus Gründen der Chemotaxonomie die Zugehörigkeit zu einer einzigen Ordnung untermauert.¹⁷⁸ 3-Alkylpyridin-Oligomere wie Halitoxin kommen in unterschiedlichen relativen Massen vor, z. B. wurden Fraktionen von 500-1000, 2000, 5000, 1000-25000 und größer 25000 beschrieben.^{179,180} Das in der vorliegenden Arbeit aus *Xestospongia rosariensis* isolierte Halitoxin (**6**) mit der relativen Masse von ca. 5200 war in allen weiteren physikalisch-chemischen Eigenschaften identisch mit bereits beschriebenem Halitoxin. Das 3-Alkylpyridin-Derivat aus *Amphimedon* sp. mit Masse von ca. 8000 wurde nicht genauer charakterisiert, da in der Literatur^{179,180} wie auch bei den hier durchgeführten Enzymhemmtests mit Halitoxin (**6**) und der Rohfraktion des *Amphimedon*-Metaboliten gezeigt wurde (siehe 3.2.2.1, 3.2.3.1), dass sich die biologischen Aktivitäten der Verbindungen auch bei unterschiedlichen relativen Massen nicht unterscheiden.

Aus der Weichkoralle *Lobophytum crassum* wurden 3 bisher nicht beschriebene (**23** - **25**) und 2 bekannte (**26**, **27**) Naturstoffe isoliert (siehe 3.2.6). Mit den beiden Cembranen (**23**, **27**) und den drei Eudesmanderivaten (**24** - **26**) wurden für Weichkorallen charakteristische terpenoide Sekundärstoffe erhalten.²¹⁸ Cembrane sind zyklisierte Diterpene und stellen eine große Naturstoffgruppe mit vielen strukturellen Variationen dar, wie z. B. weiteren Ringstrukturen und einer Vielzahl von verschiedenen funktionellen Gruppen.^{191,218} Davon sind nur wenige mit Methylester-Struktur beschrieben: ein Sarcodictyin-Derivat aus *Sarcodictyon roseum*, eine Verbindung vom Briaran-Typ aus *Stylatula* sp. (Pennatulaceae) und ein dem hier beschriebenen Cembranester (**23**) strukturell ähnliches Cembran aus *Sinularia mayi*, einer Weichkoralle aus Okinawa.^{228,229}

Weitere isolierte Naturstoffe wurden aus der Braunalge *Dictyota volubilis* erhalten und stellen typische Algenmetabolite dar.²³⁰ So wurden aus *Dictyota* sp. bekannte Diterpene (**10** - **15**, **17**) und das in Algen weit verbreitete Fucosterol (**16**) isoliert (siehe 3.2.4).¹⁹⁷ Die Aufarbeitung der Alge erfolgte, um den enthaltenen HIV-1-RT-Inhibitor zu charakterisieren. Hierbei wurde ausschließlich Dictyodial (**10**) erhalten, ein bereits bekannter Hemmstoff.⁹⁸

Aus *Ulocladium botrytis* und *Epicoccum* sp. wurden für Pilze charakteristische und bereits beschriebene Naturstoffe gefunden.^{209,210} Aus *Ulocladium botrytis* wurden die Polyketide Ulocladol (**19**), welches bereits als p56^{lck}-PTKI beschrieben wurde,¹³⁷ und Botrallin (**21**)^{215,216} sowie das eine schwache HIV-1-RT-Hemmung verursachende Makrodiol Clonostachydiol (**20**) isoliert (siehe 3.2.5).^{213,214} Aus *Epicoccum* sp. konnte nur die Pyrimidinbase Uracil (**22**) identifiziert werden (siehe 3.2.5). Durch diese Verbindungen konnten jedoch nicht

die Hemmungen der HIV-1-RT durch den *Ulocladium-botrytis*-Extrakt sowie die p56^{lck}-PTK-Hemmung durch die *Epicoccum*-sp.-Fraktionen erklärt werden. Da dies vor allem durch die geringen Substanzmengen bedingt war, sollten nach Optimierung der Kulturbedingungen und durch größere Kulturansätze in nachfolgenden Arbeiten die gesuchten Enzyminhibitoren identifiziert werden können.

4.2.2 Biologische Evaluierung der isolierten Reinsubstanzen

Insgesamt wurden aus 8 Proben (marine Tiere, Pflanzen und kultivierte Pilze) 26 Naturstoffe isoliert und nach der Identifizierung mit physikalisch-chemischen Methoden biologisch charakterisiert. Alle Reinstoffe außer Uracil (**22**) entstammten dem Sekundärstoffwechsel. Fünf Substanzen waren bisher nicht in der Literatur beschrieben: zwei Sesterterpene (**1**, **2**) aus *Hyrtios* cf. *erecta*, ein Cembranester (**23**) und zwei Eudesmanderivate (**24**, **25**) aus *Lobophytum crassum*. Die Evaluierung der Sekundärstoffe gegenüber enzymatischen und mikrobiellen Targets, wie beispielsweise auch Plasmodien, Trypanosomen und Viren, ermöglichte die erstmalige Beschreibung oder eine Erweiterung der Kenntnisse der biologischen Wirkungsspektren dieser Naturstoffe.

Das Sesterterpen (**1**), Isodehydroluffariellolid (**3**), Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) aus *Hyrtios* cf. *erecta* zeigten antimikrobielle Wirkungen in Agar-Diffusions-Tests. Isodehydroluffariellolid (**3**) und Homofascaplysin A (**4**) hemmten die p56^{lck}-PTK, nicht jedoch HIV-1-RT, was für eine gewisse Selektivität spricht. Jimenez *et al.* beschrieben die Hemmung der HIV-1-RT durch **3**, **4** und **5**, was von den hier gefundenen Aktivitäten abweicht.⁸⁶ Isodehydroluffariellolid (**3**) und Homofascaplysin A (**4**) zeigten im HIV-1-RT-Test keine Aktivität, Fascaplysin (**5**) wurde ebenfalls als HIV-1-RTI identifiziert, jedoch war die Substanz bei niedrigen Konzentrationen stärker aktiv (33 µg/ml ergaben ca. 10% Enzymrestaktivität) als in Ref. 86 beschrieben (58% Hemmung der Enzymaktivität bei 1 mg/ml). Diese Abweichungen lassen sich durch ein anderes zur Enzymaktivitätsmessung verwendetes Testsystem erklären. Es muss auch angenommen werden, dass Isodehydroluffariellolid (**3**) und Homofascaplysin A (**4**), von Jimenez *et al.* als stärker wirksam als Fascaplysin (**5**) beschrieben, dort mit anderen Hemmstoffen in geringen Konzentrationen verunreinigt waren. Fascaplysin (**5**) hemmte auch die p56^{lck}-PTK, 10% Enzymrestaktivität wurde bei 200 µg/ml erhalten. Weitere Aktivitäten von **4** und **5** wurden gegenüber Trypanosomen und Plasmodien festgestellt. Fascaplysin (**5**) hemmte *Trypanosoma brucei* ssp. *rhodesiense* im Vergleich mit dem Standard Melarsoprosol mit moderater Stärke (IC₅₀ 0,17 µg/ml im Vergleich zu 2 ng/ml). In Tests gegen *Plasmodium falciparum* zeigten Homofascaplysin A (**4**) und Fascaply-

sin (**5**) starke Hemmwirkungen. Ein Chloroquin-resistenter (K1) und ein Chemotherapeutika-sensibler (NF54) *Plasmodium falciparum* Stamm wurden von **4** und **5** in vitro mit annähernd der gleichen Potenz wie die Standardsubstanzen Chloroquin und Artemisinin inhibiert. Durch ihre Zytotoxizität können Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) jedoch nicht selbst als Wirkstoffe verwendet werden, sondern in möglicherweise anschließenden weiterführenden Untersuchungen als Leitstrukturen Ausgangspunkt für Derivate mit therapeutisch besser nutzbaren Eigenschaften sein.

Halitoxin (**6**) aus *Xestospongia rosariensis* und das aus *Amphimedon* sp. identifizierte 3-Alkylpyridin-Derivat zeigten in den hier durchgeführten Untersuchungen starke Hemmwirkungen nur im HIV-1-RT-Test, und damit die weiter oben geforderte „selektive“ Hemmung nur eines der eingesetzten Enzyme. Eine von Schmitz *et al.* isolierte Halitoxin-Fraktion wurde bereits am NCI im anti-HIV-Test in vitro untersucht.²³¹ Es wurde bestimmt, ab welcher Konzentration die Substanz kultivierte Zellen (humane T-Lymphozyten, CEM-6) zu 50% vor einer Infektion mit HIV schützen konnte (hier: EC₅₀-Wert). Ebenfalls wurde ermittelt, bei welcher Konzentration Halitoxin an 50% der kultivierten, nicht-virusinfizierten CEM-6-Zellen Zytotoxizität zeigte (hier: IC₅₀-Wert). Daraus errechnete sich als Quotient aus IC₅₀- / EC₅₀-Wert ein sogenannter Therapeutischer Index TI. Für Halitoxin liegt der IC₅₀-Wert bei 4,63 µg/ml und der EC₅₀-Wert bei 1,15 µg/ml. Die Substanz mit einem TI = 4 wurde als moderat antiviral wirksam eingestuft.²³² In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 50% Hemmung der HIV-1-RT durch Halitoxin (**6**) in einem Konzentrationsbereich ähnlich dem oben genannten IC₅₀-Wert lag. Im HIV-1-RT-Test ebenfalls untersuchte niedermolekulare 3-substituierte Pyridinderivate (siehe 3.2.2.1) waren inaktiv, was die Verwendbarkeit von **6** als Leitstruktur in Frage stellt. Die bei der Isolierung von Halitoxin (**6**) festgestellte Oberflächenaktivität lässt eine unspezifischen Hemmung der HIV-1-RT vermuten, die durch Denaturierung des Enzyms verursacht werden könnte. Weitere biologische Tests zeigten eine schwache antiplasmodiale Aktivität (FCR3F86-Stamm) von Halitoxin (**6**) (IC₅₀-Wert 4,2 µg/ml), die jedoch wenig selektiv im Vergleich mit der ebenfalls beobachteten Zytotoxizität gegenüber KB-Zellen war (IC₅₀-Wert 7,3 µg/ml).

Die biologischen Untersuchungen der aus *Lobophytum crassum* erhaltenen Substanzen (**23** - **27**) ergab für 2S,7S,8S-Sarcophytoxid (**27**) eine antialgale Aktivität gegenüber der Mikroalge *C. fusca* (siehe 3.2.6.1). In der Literatur sind ökologisch relevante antialgale Wirkungen des 3E,5E-Eudesmanderivates (**26**), einem Sarcophytoxid, von welchem die Stereochemie nicht beschrieben wurde, und anderen strukturell verwandten Cembranen beschrieben.^{233,234} Hieraus konnte abgeleitet werden, dass die Hemmung des Algenwachstums durch Cembrane von dem Vorhandensein eines Dihydrofuran-Ringes und einer Epoxid-Gruppe abhängig ist. Diese Strukturmerkmale weist 2S,7S,8S-Sarcophytoxid (**27**) im Gegen-

satz zu **23** auf, und die Wirkung im Agar-Diffusions-Test von **27**, aber nicht von **23**, deckt sich mit den vorgeschlagenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen für eine antialgale Aktivität von Cembranen.²³⁴

Aus der Braunalge *Dictyota volubilis* wurden die Diterpen **10-15** und **17** sowie Fucosterol isoliert. Von diesen Diterpenen wurden bereits antimikrobielle, zytotoxische und ökologisch wichtige biologische Aktivitäten beschrieben.^{194,195,196} Die Hemmung der HIV-1-RT durch den Extrakt der Braunalge *Dictyota volubilis* ließ sich ausschließlich auf den als HIV-1-RTI bekannten Dialdehyd Dictyodial (**10**) zurückführen.⁹⁸ Dictyodial (**10**) inhibierte ebenfalls die p56^{lck}-PTK. Das Reduktionsprodukt, Dictyodiol (**18**), zeigte keine Aktivität in den Enzymtests. Daraus wurde abgeleitet, dass die Aldehydgruppen von Dictyodial (**10**) eine unspezifische Hemmung beider Enzyme verursachten. Braunalgen sind reich an Sekundärstoffen mit pharmazeutisch relevanten Aktivitäten,¹⁹¹ jedoch konnten aus *Dictyota volubilis* keine neuartigen Inhibitoren der untersuchten Enzyme isoliert werden.

Ulocladium botrytis und *Epicoccum* sp. wurden untersucht, da Sekundärstoffe von aus marinen Organismen isolierten Pilzen bereits potente biologische Aktivitäten gezeigt haben.^{209,210} Die aus diesen Pilzen isolierten Substanzen (**19-22**) zeigten alle nur schwache oder keine Aktivitäten in den verwendeten biologischen Tests (siehe 3.2.5.1), Ulocladol (**19**) wurde in einer Zusammenarbeit mit U. Höller als moderater p56^{lck}-PTKI erkannt.¹³⁷ Bei der Fraktionierung der beiden Pilzextrakte und Untersuchungen mit ¹H-NMR-Spektroskopie und HIV-1-RT- und p56^{lck}-PTK-Enzymtests wurden Fraktionen und Reinsubstanzen erhalten, die PTKI enthielten bzw. darstellten (siehe 3.2.5.2). Eine Identifizierung dieser potentiellen Enzymhemmstoffe konnte wegen zu geringer Substanzmengen nicht erfolgen. Eine detaillierte Analyse beider Pilze, z. B. bei optimierten Kulturbedingungen, stellt einen erfolgversprechenden, über diese Arbeit hinausgehenden Ansatz zum Auffinden neuer Hemmstoffe der PTK p56^{lck} dar. Auch die HIV-1-RT-Hemmung durch *Ulocladium-botrytis*-Extrakte und -Fraktionen sollte dabei nochmals untersucht werden.

Es wurden Schwämme, eine Weichkoralle, eine Braunalge und Pilze untersucht und die erhaltenen Naturstoffe isoliert und charakterisiert. Diese Auswahl von Organismen aus verschiedenen marinen Habitaten erwies sich als reich an sekundären Naturstoffen mit pharmazeutisch-medizinischer und biologischer Bedeutung. Dabei handelte es sich um Di- und Sesterterpene, Alkaloide, weitere stickstoffhaltige Sekundärstoffe und Acetogenine. Es wurden Inhibitoren der HIV-1-RT und der p56^{lck}-PTK gefunden.

Die weitere biologische Evaluierung der Reinstoffe zeigte das Potential mariner Naturstoffe als Leitstrukturen für Malariatherapeutika und als „Antifoulings“ gegen Algenbewuchs. Obwohl aus den kultivierten Pilzen keine neuartigen Enzyminhibitoren isoliert wur-

den, konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Fraktionen potentielle Hemmstoffe enthalten.

Eine derzeit noch ungeklärte Problemstellung entsteht bei Betrachtung der symbiotischen Systeme von Mikro- und Makroorganismen. Hier ergibt sich die schwer zu beantwortende Frage nach dem eigentlichen Wirkstoffproduzenten – Mikro- oder Makroorganismus. Eine Antwort hierauf konnte und sollte nicht Gegenstand dieser Arbeit sein, jedoch zeigt dieses Problem beispielhaft die Komplexität von biologischen Systemen als „Naturstoffproduzenten“. Die pharmazeutisch-medizinische Nutzung von Makroorganismen scheitert leider fast immer an der Unmöglichkeit definierte und reproduzierbare Bedingungen für die Kultivierung zu schaffen. Dies rückt isolierte Mikroorganismen wegen der leicht optimierbaren Kultivierungsbedingungen als Quelle für pharmazeutisch verwertbare Strukturen in den Brennpunkt des wissenschaftlichen Interesses. So besitzen Pilze als Produzenten von biologisch aktiven Inhaltsstoffen das wohl größte Potential. Mit diesem Ansatz können erfolgversprechende Kandidaten für Arzneistoffe gefunden und in fast beliebiger Menge erhalten werden, unabhängig von Exkursionen in geographisch weit entfernte Regionen und der Einhaltung von Naturschutzauflagen. Eine in ökonomischer und ökologischer Hinsicht vielversprechende Gewinnung wirksamer Pharmazeutika ist so möglich.

5 Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen AIDS, Autoimmunkrankheiten und Leukämie wurde die Hemmung von HIV-1-RT (AIDS) und p56^{lck}-PTK (Autoimmunkrankheiten und Leukämie) durch Extrakte von Makro- und Mikroorganismen aus unterschiedlichen Habitaten untersucht. Die getesteten Proben stammten von marinen Makroorganismen, Cyanobakterien, obligat und fakultativ marinen Pilzen, marinen Bakterien und Samenpflanzen.

Aus in diesen Untersuchungen als wirksam aufgefallenen Extrakten erfolgte mit Hilfe der Enzymhemmtests sowie parallel durchgeführten chemisch-physikalischen Analysen die Isolierung von Inhibitoren. Die Strukturaufklärung, vor allem durch NMR-spektroskopische und MS Methoden, führte zur eindeutigen Charakterisierung der wirksamen Substanzen. Daran anschließende weitere biologische Tests, wie z. B. zur Zytotoxizität der Verbindungen, ermöglichten eine erste Abschätzung, ob sich die isolierten Hemmstoffe als Arzneistoffe oder als Leitstrukturen eigneten.

Außergewöhnliche Taxa, ökologische Beobachtungen im Feld und ¹H-NMR-spektroskopische Daten gaben Hinweise auf strukturell besondere Inhaltsstoffe bei in den biologischen Tests inaktiven Extrakten, wodurch eine dieser Proben ebenfalls für die Aufarbeitung ausgewählt wurde.

Insgesamt wurden die Extrakte von 8 Organismen im Detail untersucht, und zwar von drei Schwämmen, einer Weichkoralle, zwei Algen und zwei Pilzen. Dabei wurden 26 Naturstoffe, darunter 5 bisher nicht beschriebene Sester- (**1**, **2**) und Diterpene (**23** - **25**), isoliert und chemisch und biologisch charakterisiert.

Isodehydroluffariellolid (**3**), Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**) aus *Hyrtios* cf. *erecta*, Halitoxin (**6**) aus *Xestospongia rosariensis*, Dictyodial (**10**) aus *Dictyota volubilis* und Ulocladol (**19**) und Clonostachydiol (**20**) aus *Ulocladium botrytis* hemmten HIV-1-RT oder p56^{lck}-PTK oder beide Enzyme (Verbindungen **5**, **10**). Potente Aktivitäten in antiplasmodialen Tests zeigten Homofascaplysin A (**4**) und Fascaplysin (**5**), jedoch verbunden mit starker Zytotoxizität, so dass sich die Verbindungen möglicherweise in weiterführenden Studien als Leitstrukturen nutzen lassen.

6 Anhang

6.1 Teil 1: Herkunft der Organismen und biologische Aktivitäten der Extrakte

Die geographische Herkunft bzw. bei Cyanobakterien die Stammsammlung wurde bei den Organismen entsprechend der Ziffern in Tabelle 25 hinter der Artbezeichnung angegeben (Abschnitte 6.1.1 bis 6.1.4). Wurden verschiedene Proben derselben Art/Gattung untersucht, so sind alle Standorte bzw. Stammsammlungen angegeben.

Tabelle 25: Kodierung der Herkunft von Makroorganismen und Cyanobakterien

Ziffer	Herkunft/Sammelort ^a
1	Helgoland
2	Osterschelde, Niederlande (CT 398)
3	Fiji (CT 198)
4	Dominica (CT 193)
5	Großes Barriere Riff, Australien (CT 2904, CT 293, CT 902, LL)
6	Teneriffa (CT 195, CT 912)
7	Amrum
8	Arktis
9	Antarktis
10	Spitzbergen
11	Hainan
12	Lanzarote (CT 911)
13	Malta (CT 190)
14	Azoren (CT 197)
15	Deutsche Nordseeküste

Ziffer	Herkunft/Sammelort ^a
16	Deutsche Ostseeküste
17	Müggelsee
18	Lüneburger Heide
19	La Réunion (Frankreich)
20	Orpheus Island (Australien)
21	EAWAG, Dübendorf, Schweiz
22	Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen
23	Max-Planck-Institut für Ökologische Physiologie, Plön
24	Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie, Universität Bremen

^a CT-Nummern: Bezeichnung der Sammel-exkursion

Die Hemmung der enzymatischen Aktivität von HIV-1-RT und p56^{lck} wird durch Hochzeichen gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit detailliert untersuchten Arten sind durch Fettdruck hervorgehoben (Tabelle 26).

Tabelle 26: Kennzeichnung der im Screening aktiven Proben

Format	Aktivität ^a
<i>Gattung/Art</i> [†]	Hemmung der HIV-1-RT
<i>Gattung/Art</i> [§]	Hemmung der PTK p56 ^{lck}
<i>Gattung/Art</i> [¶]	Hemmung von HIV-1-RT und PTK p56 ^{lck}
<i>Gattung/Art</i>	Untersuchung des Organismus: siehe 3.2

^a Aktivitätskriterien: siehe 3.1.1

6.1.1 Marine Makroorganismen

a) 15 Bryozoa

Bugula plumosa[‡] (1, 2), *Electra pilosa*[‡] (1, 2), *Flustra foliacea* (1), *Schizoporella errata* (1), *Scrupocellaria scruposa* (1), 8 nicht bestimmte Arten (1)

b) 13 Chordata

Aplidium glabrum (2), *Ascidella aspersa* (1, 2), *Botryllus schlosseri* (1), *Ciona intestinalis*[‡] (2), *Clavellina* sp. (1), *Didemnum lahillei* (2), *Mogula manhallensis* (2), *Palythoa* sp. (3), *Polycarpa aurata*[§] (2), *Styela clava*[‡] (2), 2 nicht bestimmte Arten[‡] (3)

c) 37 Cnidaria

Gorgonaria (Hornkorallen): *Porites* sp.[‡] (3) und 7 nicht bestimmte Arten (3, 4); **Alcyonaria** (Weichkorallen): *Alcyonium digitatum* (1), *Capnella* sp. (5), *Cladiella* sp. (5), *Lemnalia* sp. (5), ***Lobophytum crassum*** (5), *Lobophytum* sp. (3), *Parerythropodium* sp. (5), *Palythoa* sp. (5), *Sarcophyton* sp.[‡] (3, 5), *Sinularia* sp.[‡] (3, 5), 9 nicht bestimmte Arten[‡] (3)

d) 2 Mollusca

Aplysia dactylomela (6), *Buccinum undatum* (7)

e) 93 Phycophyta

26 **Chlorophyceae**: *Acro* sp.[§] (11), *Boegessenia forbesii* (11), *Boodlea composita* (11), *Caulerpa prolifera*[¶] (6), *Chlorodesmis fastigiata* (5), *Cladophora* sp.[§] (11), *Dasycladus* sp.[‡] (9), *Dictyosphaeria cavernosa* (11), *Enteromorpha bulbosa* (9), *Enteromorpha compressa*[§] (11), *Enteromorpha* sp.[¶] (11), *Lambia* sp.[‡] (11), *Struvea* sp.[‡] (11), *Udotea* sp.[‡] (6), *Ulva conglobata* (11), *Ulva fasciata*[¶] (11), *Valonia* sp.[‡] (11), 4 nicht bestimmte Grünalgen[¶] (6, 11);

18 **Phaeophyceae**: *Adenocystis utricularis*[§] (9), *Alaria esculenta*[‡] (10), *Ascoseira mirabilis*[§] (9), *Chorda tomentosa*[‡] (10), *Cystoseira* sp.[§] (5, 12, 13), *Delesseria lancifolia* (9), *Desmarestia menziesii*[§] (9), *Dictyopteris delicatula* (5), *Dictyopteris membranacea* (13), *Dictyota dichotoma*[‡] (13), ***Dictyota volubilis***[¶] (5), *Himanthothallus grandifolius*[§] (9), *Laminaria saccharina*[§] (10), *Sacchoriza dermatonema* (10), *Stypopodium zonale* (12), 1 nicht bestimmte Braunalge[‡] (6);

44 **Rhodophyta**: *Ballia* sp.[‡] (11), *Curidea racivitsae* (9), *Dasya* sp. (6), *Delesseria lancifolia* (9, 10), *Delisea* sp., *Falkenbergia hillbrandii*, *Gigartina skottsbergii*[§] (9), *Gracilaria chaugii*[§] (11), *Gracilaria transtigi* (11), ***Gymnogongrus antarcticus***[¶] (9), *Hymenocladopsis crustigena*[§] (9), *Hymenocladopsis* sp. (9), *Hypnea pinnosa* (5), *Hypnea spinella*[§] (11), *Iridea cordata* (9), *Kallymenia antarctica*[§] (9), *Laurencia implicata* (5), *Laurencia* sp. (11), *Myriogram-*

me mangini (9), *Myriogramme smithii*[§] (9), *Myriogramme* sp.[‡] (8), *Neuroglossum* sp.[‡] (10), *Pachymenia stipitata* (9), *Palmaria decipiens* (9), *Panthoneura plocarmioides* (9), *Phycodrys querc.* (10), *Phycodrys rubens* (10), *Phycodrys* sp.[‡] (10), *Phyllophora ahnfeltioides*[‡] (9), *Phyllophora appendiculata*[§] (10), *Piconiella plumosa* (9), *Plocamium cartilagineum*[¶] (9), *Polysiphonia urceolata* (8), *Porphyra endividi* (11), *Ptilota plumosa* (10), *Rhodochorton* sp. (9), *Rhodymenia subantarctica* (9, 10), 2 nicht bestimmte Rotalgen (6, 10)

f) 78 Porifera

Acanthella sp. (3), *Agelas coniferae*[§] (4), *Agelas dispar* (4), *Agelas oroides* (6), ***Amphimedon* sp.**[‡] (3), *Axinella* sp. (6), *Callyspongia flammea* (5), *Chondrosia reniformis* (6), *Dysidea* sp. (3), *Ectyplasia perox* (4), ***Hyrtios cf. erecta***[¶] (3), *Iotrochota birotulata* (4), *Ircinia dendroides* (12), *Ircinia oros* (6), *Ircinia variabilis* (6), *Laxosuberitis rugosa*[‡] (14), *Neofibularia nolitangere*[‡] (4), *Nyphates erecta* (4), *Phyllospongia* sp. (5), *Verongia* sp. (5), ***Xestospongia rosariensis***[‡] (4), 53 nicht bestimmte Schwammarten[¶] (3, 5, 6, 12, 13)

6.1.2 Cyanobakterien

Anabaena sp. (24), *Anabaena torulosa* (24), *Anabaenopsis siamensis* (22), *Aphanizomenon flos-aquae* (17, 21, 23), *Aphanizomenon* sp. (17), *Fischerella ambigua* (21), *Lyngbya aestuarii* (24), *Lyngbya* sp.[‡] (16, 20), *Mastigocladus* sp. (22), *Microcystis aeruginosa*[‡] (17, 23), *Microcystis viridis* (23), *Oscillatoria corallinae* (22), *Oscillatoria limnetica* (24), *Oscillatoria* sp. (18, 22, 24), *Phormidium corium* (22), *Phormidium ectocarpum* (22), *Phormidium* sp. (22), *Plectonema* sp. (18), *Pleurocapsa* sp. (22), *Scytonema* sp. (22), *Staniera* sp. (22), *Tolypothrix byssoidea*[‡] (22), *Tolypotrix distorta* (22), *Tolypotrix elenkenii* (22), 20 nicht bestimmte Stämme[§] (16, 17, 18, 19, 24)

6.1.3 Pilze

6.1.3.1 Zur Isolierung von Pilzstämmen verwendete Makroorganismen

a) Phycophyta

Cystoseira foeniculaceus (14), *Dictyota dichotoma* (14), *D. variabilis* (14), *Plocamium* sp., *Enteromorpha* sp. (14), *Fucus spiralis* (14), *Fucus vesiculosus* (15), *Laminaria* sp. (15), *Pe-*

talonía zostenifolia (16), *Porphyra* sp. (15), *Ulva* sp., *Valonia utricularis* (14), 5 nicht identifizierte Braun- oder Rotalgenarten, S 2,

b) Porifera

Halichondria panicea Pallas 1766 von 2 verschiedenen Standorten (1), *Myxilla incrustans* Johnston 1842 (1), *Leucosolenia* sp. (1), *Sycon* sp. (1), 1 nicht identifizierter Schwamm (14)

c) Samenpflanzen

Posidonia oceanica (Posidoniaceae)

6.1.3.2 Untersuchte Pilzisolat

Acremonium sp., *Arthrimum* sp., *Ascochyta salicornia*[§], *Asteromyces cruciatus*, *Bispora betulina*, *Chlorospora*, *Coniothyrium* sp.[§], *Cylindrocarpon* sp., *Dendriphiella salina*[¶], *Drechslera* sp.[§], *Eidamella deflexa* (= *Myxotichum*), *Emericellopsis* sp., ***Epicoccum* sp.**[§], *Fusarium* sp.[‡], *Gliocladium* sp., *Leptosphaeria* sp.[§], *Microascus* sp., *Microsphaeropsis* sp.[¶], *Monochaetia* sp.[‡], *Myrioconium* sp., *Niesslia* sp., *Myrioconium* sp.[‡], *Paecilomyces* sp., *Phialophora* sp.[‡], *Phialophorophoma litoralis*[‡], *Phoma* sp.[¶], *Preussia* sp.[¶], *Scolebasidium constrictum*[‡], *Scopulariopsis* sp., ***Ulocladium botrytis***[¶], *Varicosporina ramulosa*[‡], 23 nicht bestimmte Pilzstämm[¶]

6.1.4 Samenpflanzen

a) Pflanzen aus Zaire

Amorphophallus sp.[‡] (Araceae), *Celosia trigyna* (Amaranthaceae), *Cissampelos mucronata* (Menispermaceae), *Myrianthus arboreus* (Moraceae), *Otiophora pauciflora* (Rubiaceae), *Polyscias fulva* (Araliaceae) *Rubus rigidus*[¶] (Rosaceae)

b) Pflanzen aus dem Sudan

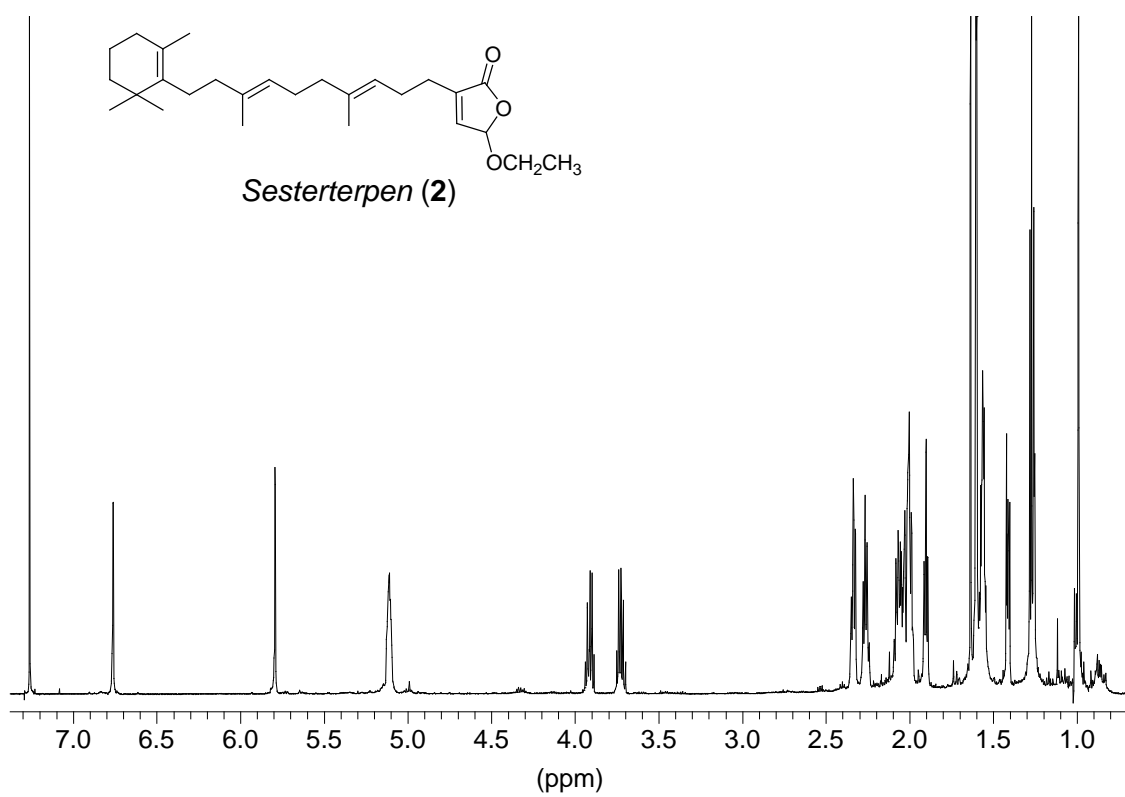
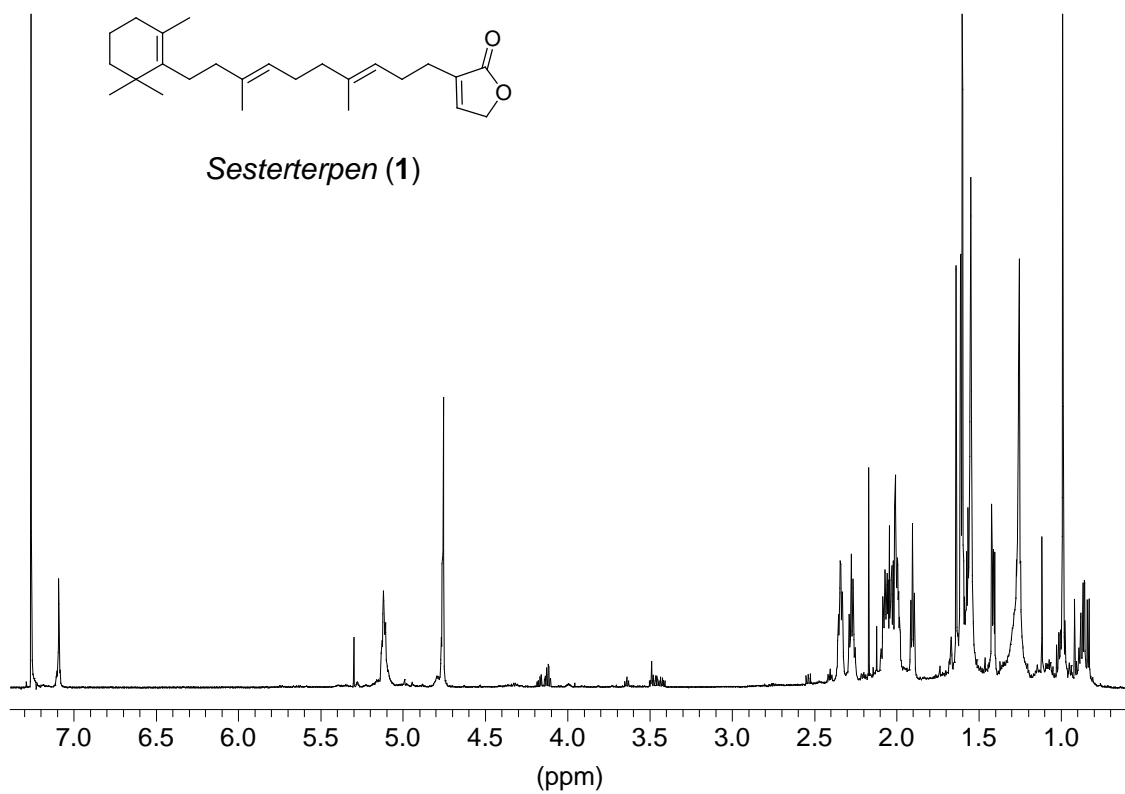
Acanthospermum hispidum[§] (Compositae), *Aristolochia bacteolata*[§] (Aristolochiaceae), *Boscia senegalensis* (Capparidaceae), *Capparis decidua* (Capparidaceae), *Cassia occidentalis* (Caesalpinaceae), *Catha edulis*[¶] (Celastraceae), *Cissus quadrangularis* (Vitaceae), *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae), *Combretum hartmanianum*[¶] (Combretaceae), *Crinum*

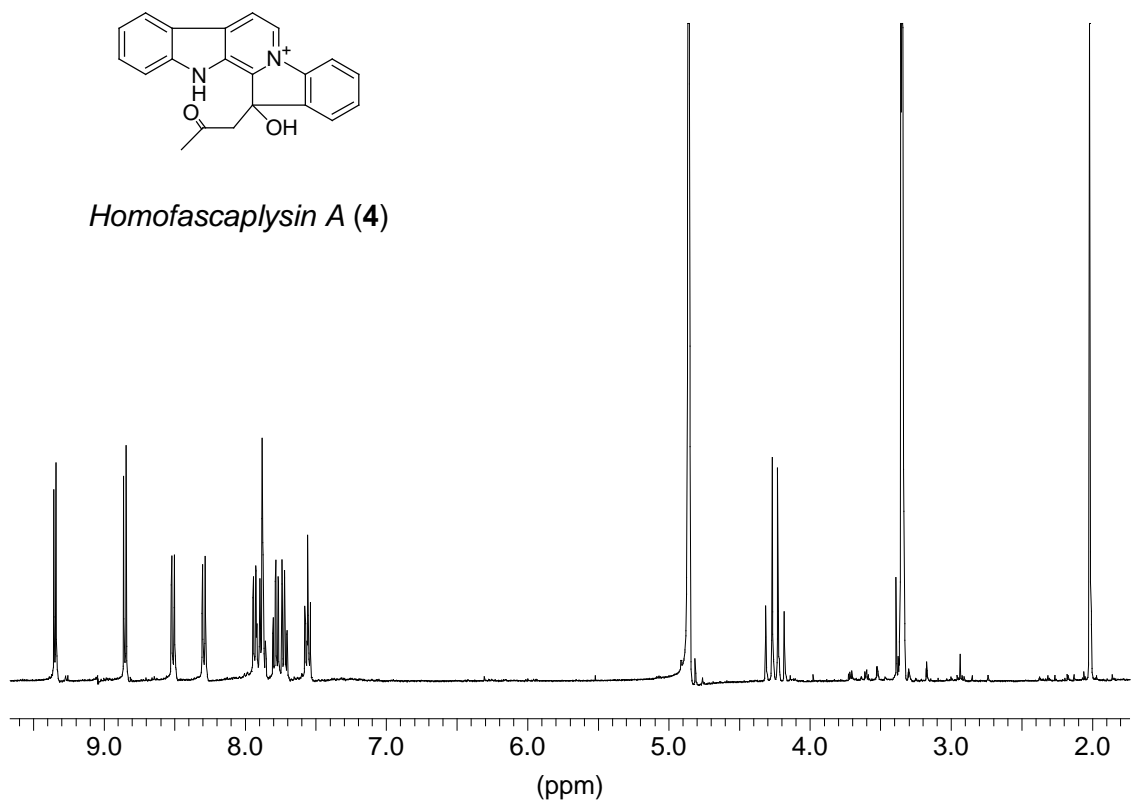
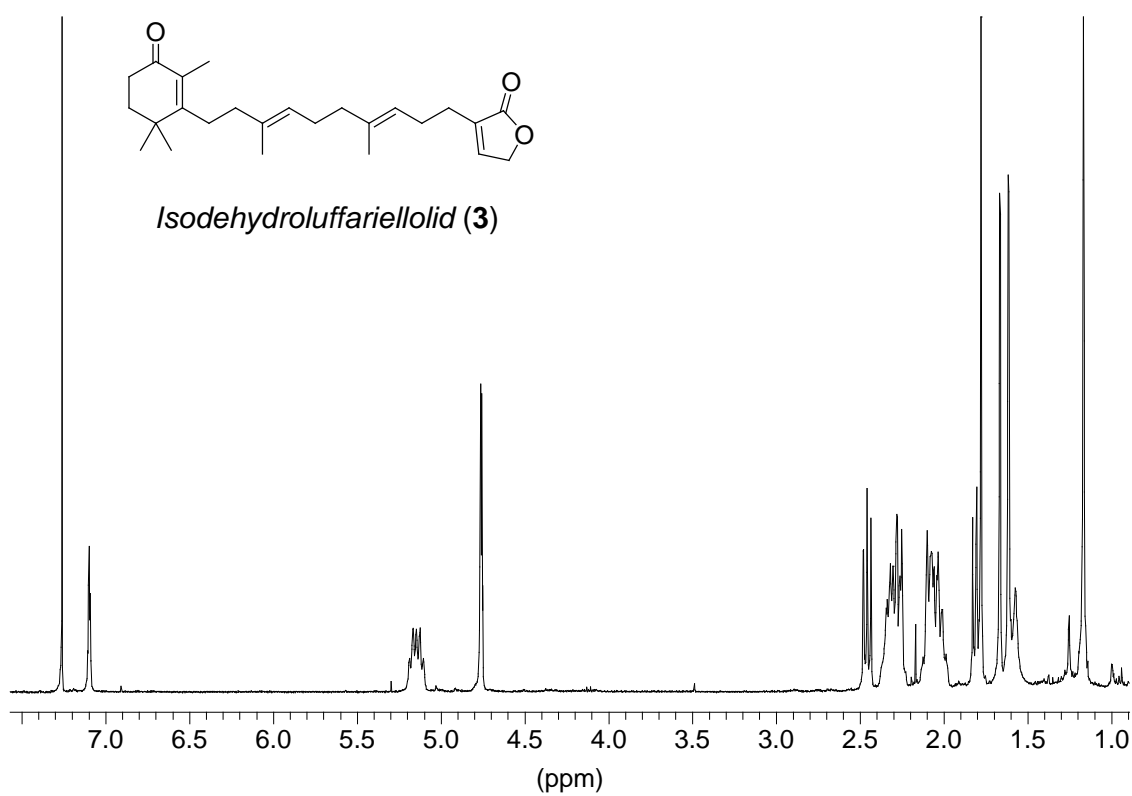
amabile (Amaryllidaceae), *Croton zambiscus*[¶] (Euphorbiaceae), *Erythrina abyssinica*[§] (Papilionaceae), *Euphorbia thi*[†] (Euphorbiaceae), *Gardenia lutea*[§] (Rubiaceae), *Haplophyllum tuberculatum*[†] (Rutaceae), *Maerua oblongifolia* (Capparidaceae), *Moringa olifera*[§] (Moringaceae), *Paminanthe peruviana*[†] (Amaryllidaceae), *Salvadora persica*[§] (Salvadoraceae), *Tamarix nilotica*[§] (Tamaricaceae), *Ziziphus spina christi*[¶] (Rhamnaceae)

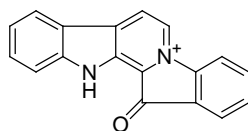
6.2 Teil 2: ^1H -NMR-Spektren von Reinsubstanzen

Verzeichnis der abgebildeten ^1H -NMR-Spektren:

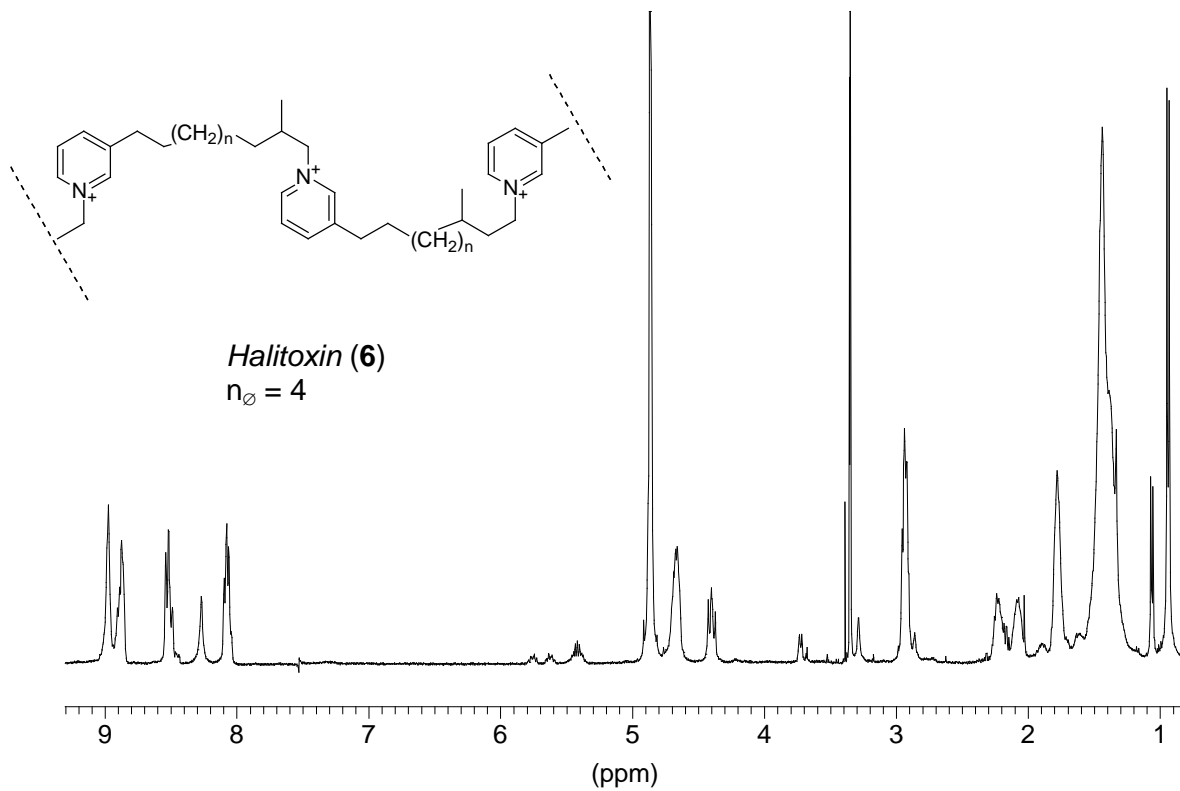
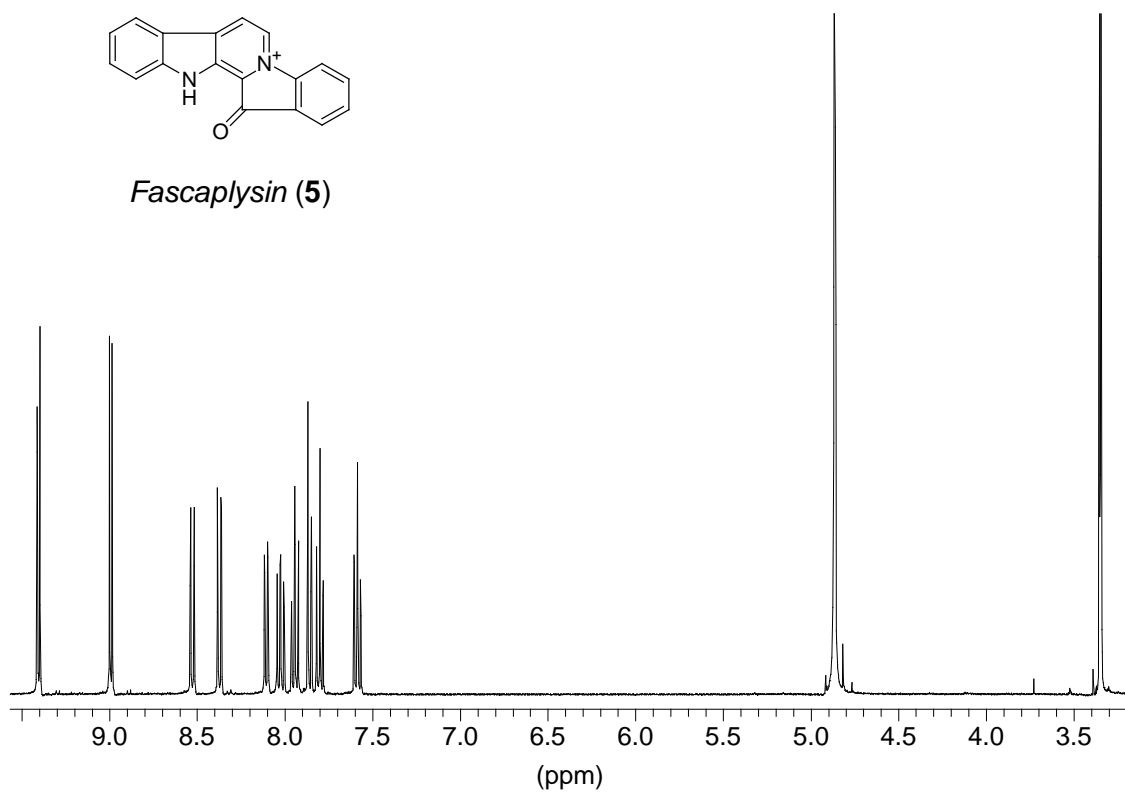
Verbindung	Seite
<i>Sesterterpen (1)</i>	105
<i>Sesterterpen (2)</i>	105
<i>Isodehydroluffariellolid (3)</i>	106
<i>Homofascaplysin A (4)</i>	106
<i>Fascaplysin (5)</i>	107
<i>Halitoxin (6)</i>	107
<i>Dictyotalid B (11)</i>	108
<i>10-Acetoxy-18-hydroxy-2,7-dolabelladien (12)</i>	108
<i>Dictyol B (14)</i>	109
<i>Acetoxycrenulid (15)</i>	109
<i>Dictyol C (17)</i>	110
<i>Dictyodiol (18)</i>	110
<i>Botrallin (19)</i>	112
<i>Clonostachydiol (20)</i>	111
<i>Ulocladol (21)</i>	111
<i>Cembranmethylester (23)</i>	112
<i>3E,5Z-Eudesmanderivat (24)</i>	113
<i>3Z,5E-Eudesmanderivat (25)</i>	113
<i>3E,5E-Eudesmanderivat (26)</i>	114
<i>2S,7S,8S-Sarcophytoxid (27)</i>	114

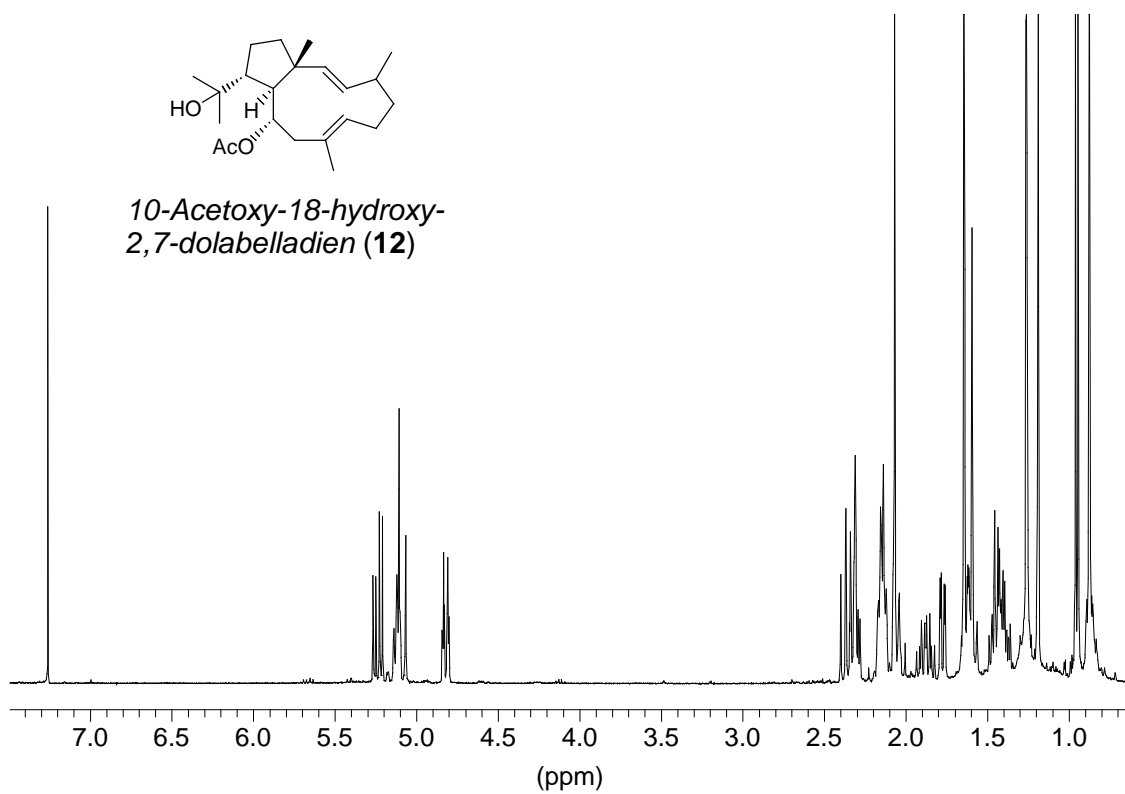
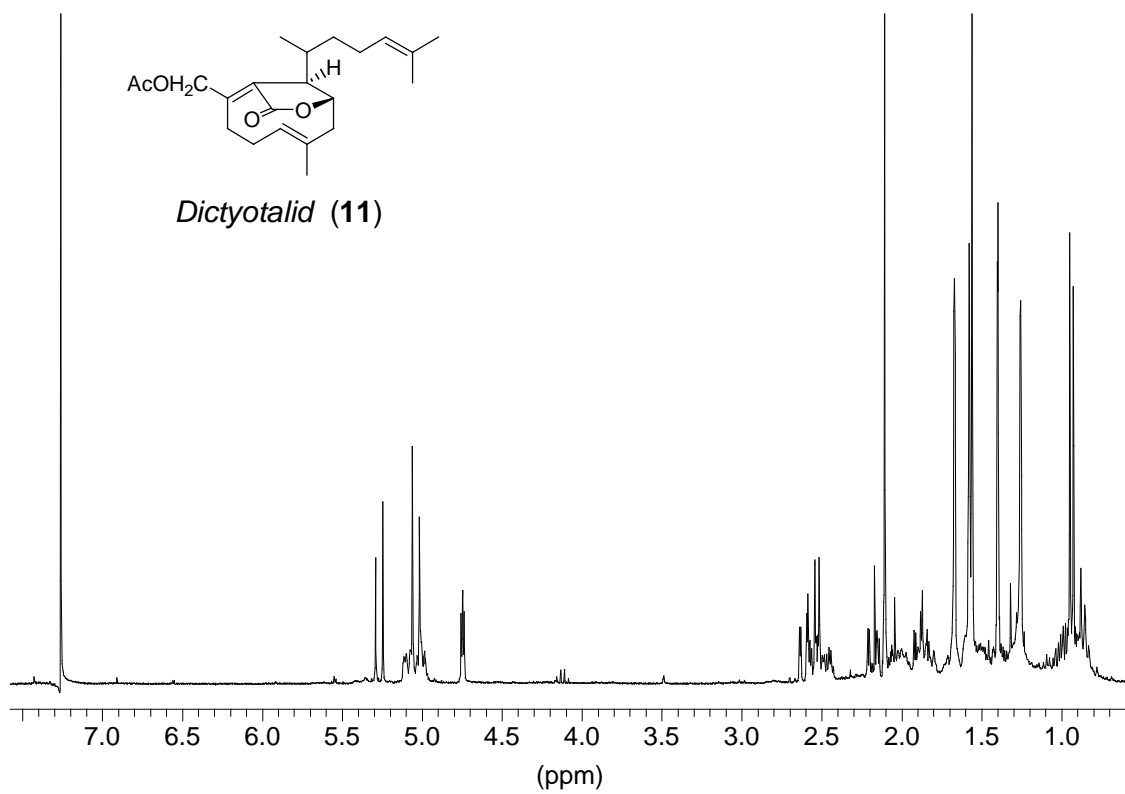


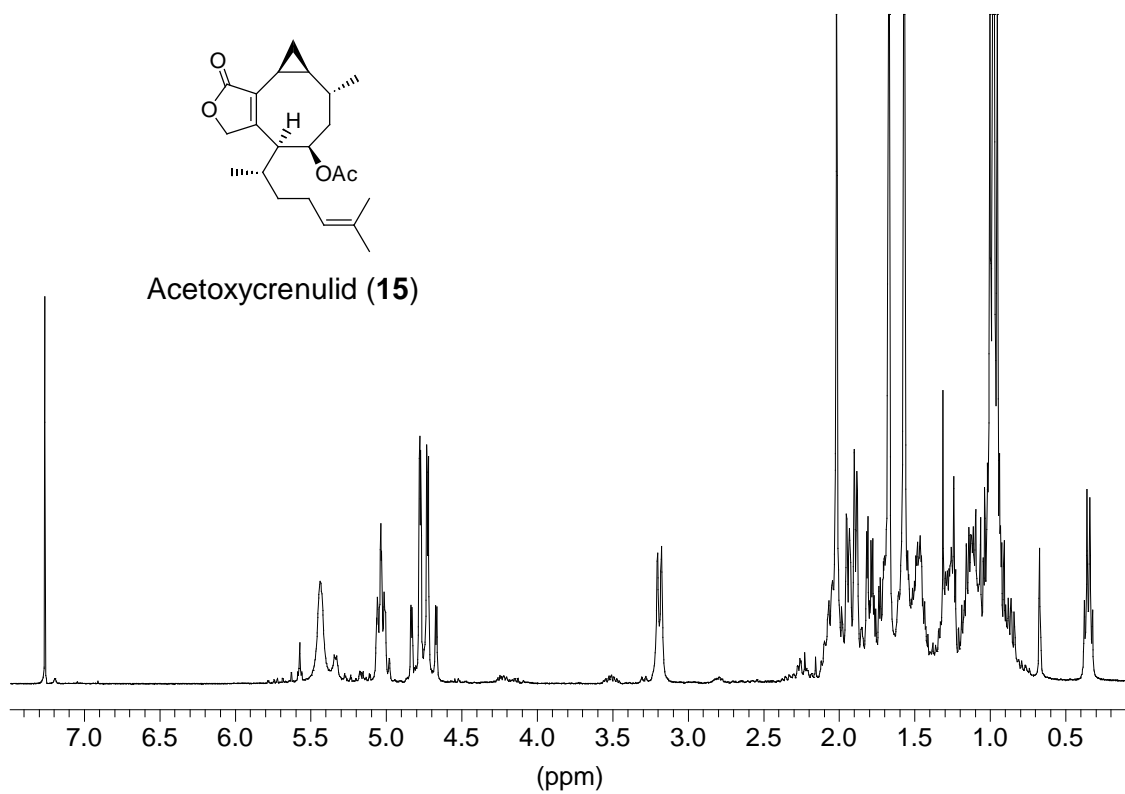
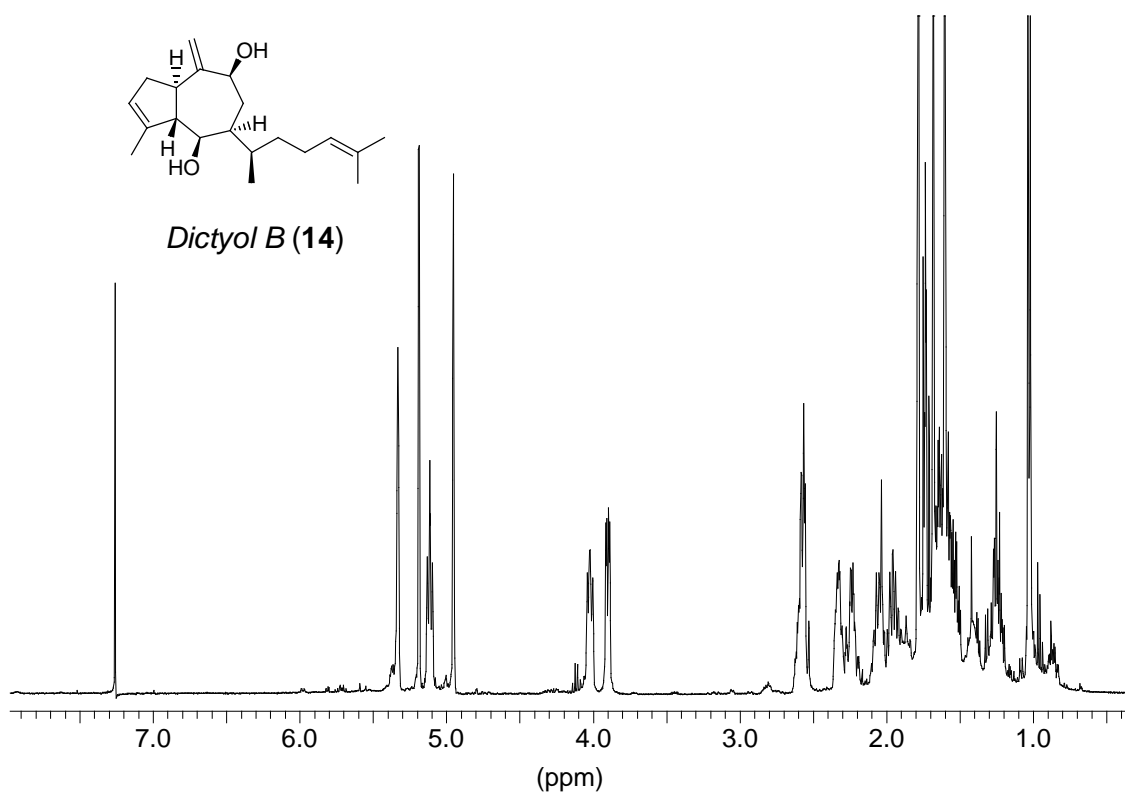


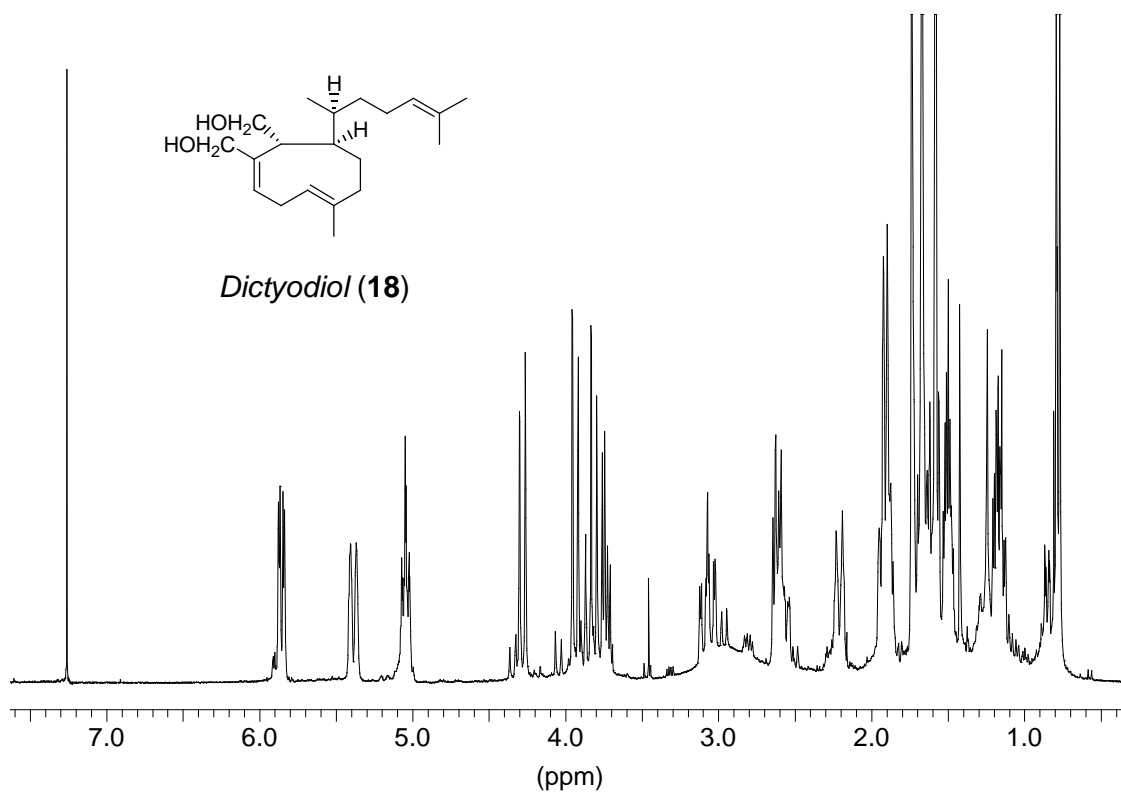
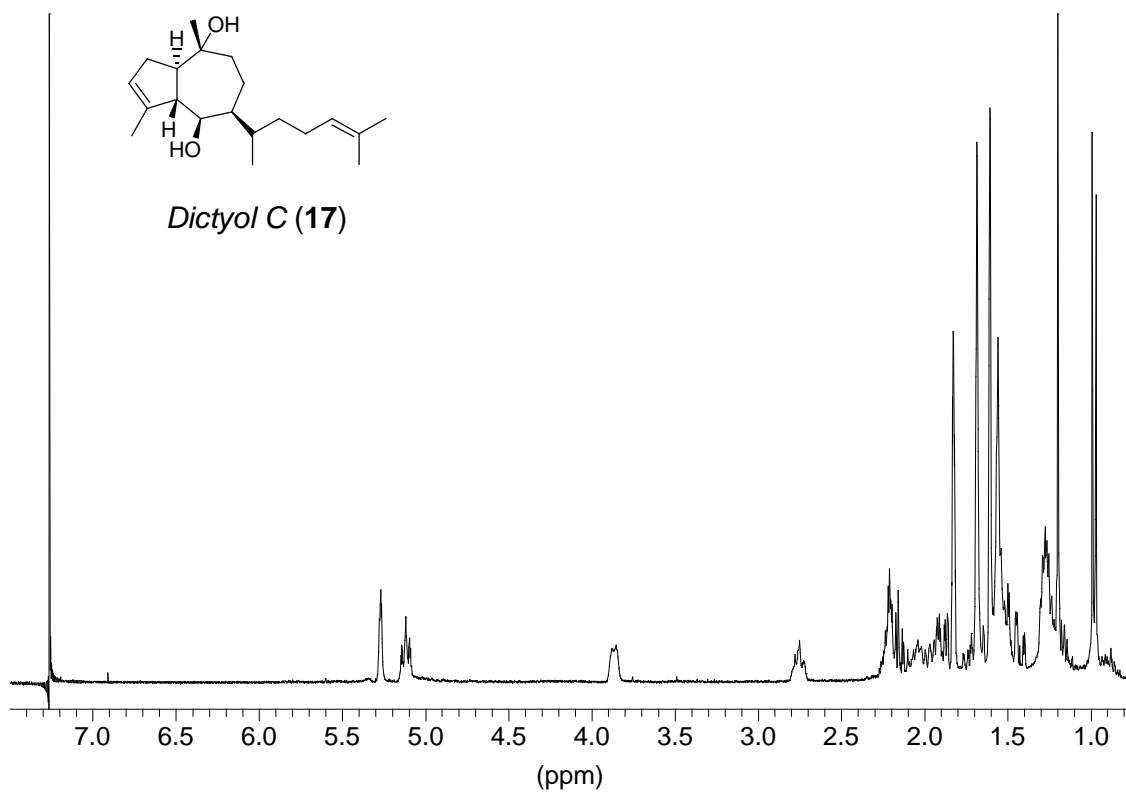


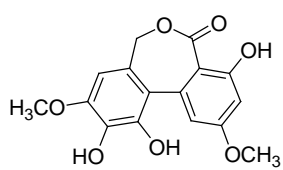
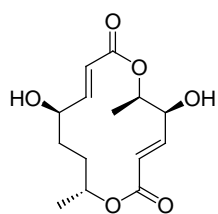
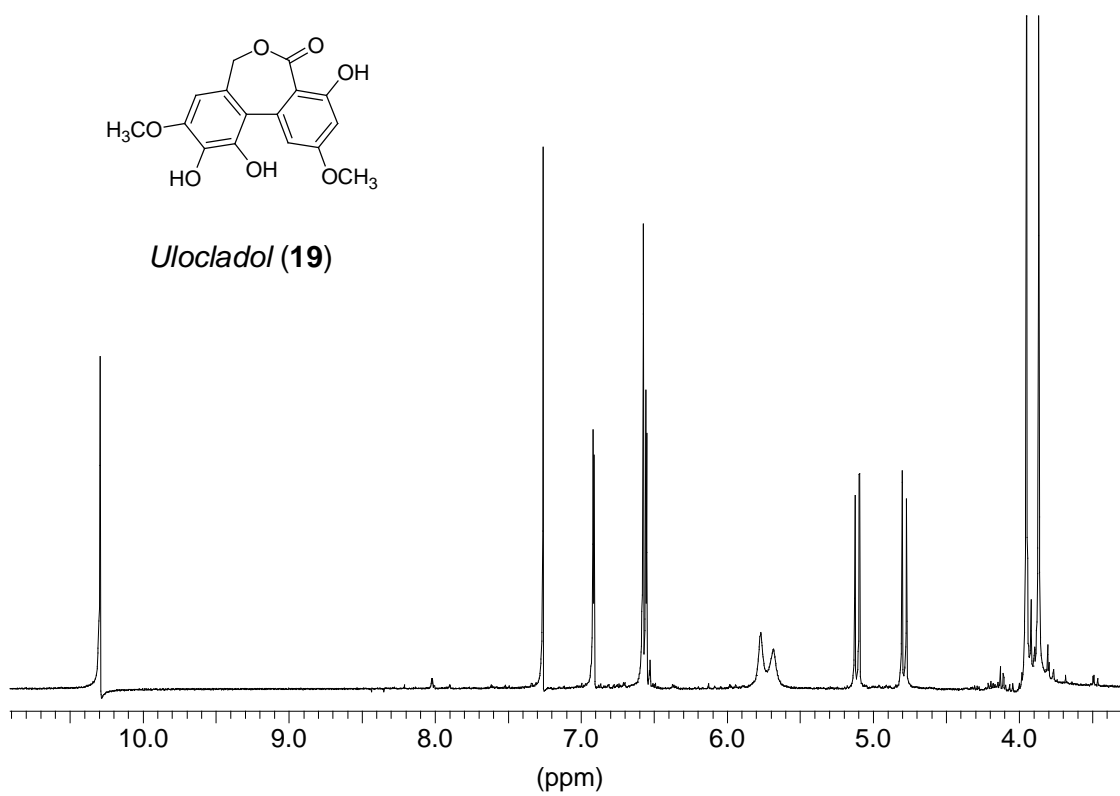
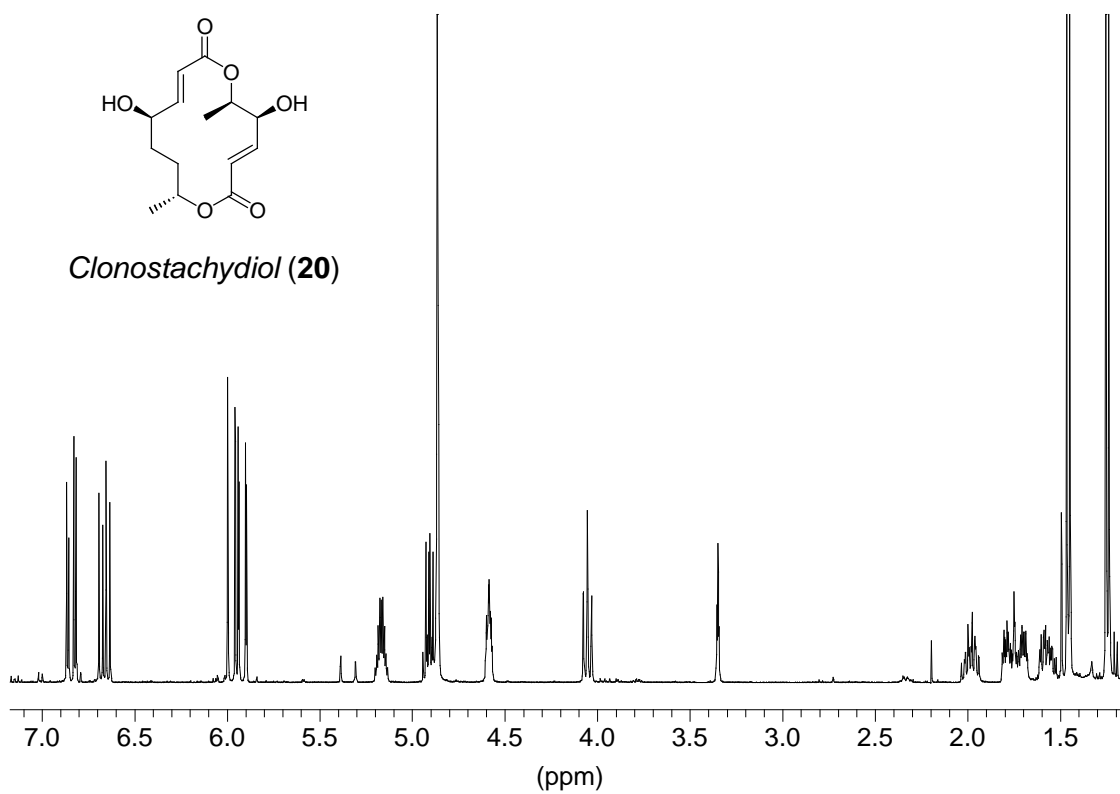
Fascaplysin (5)

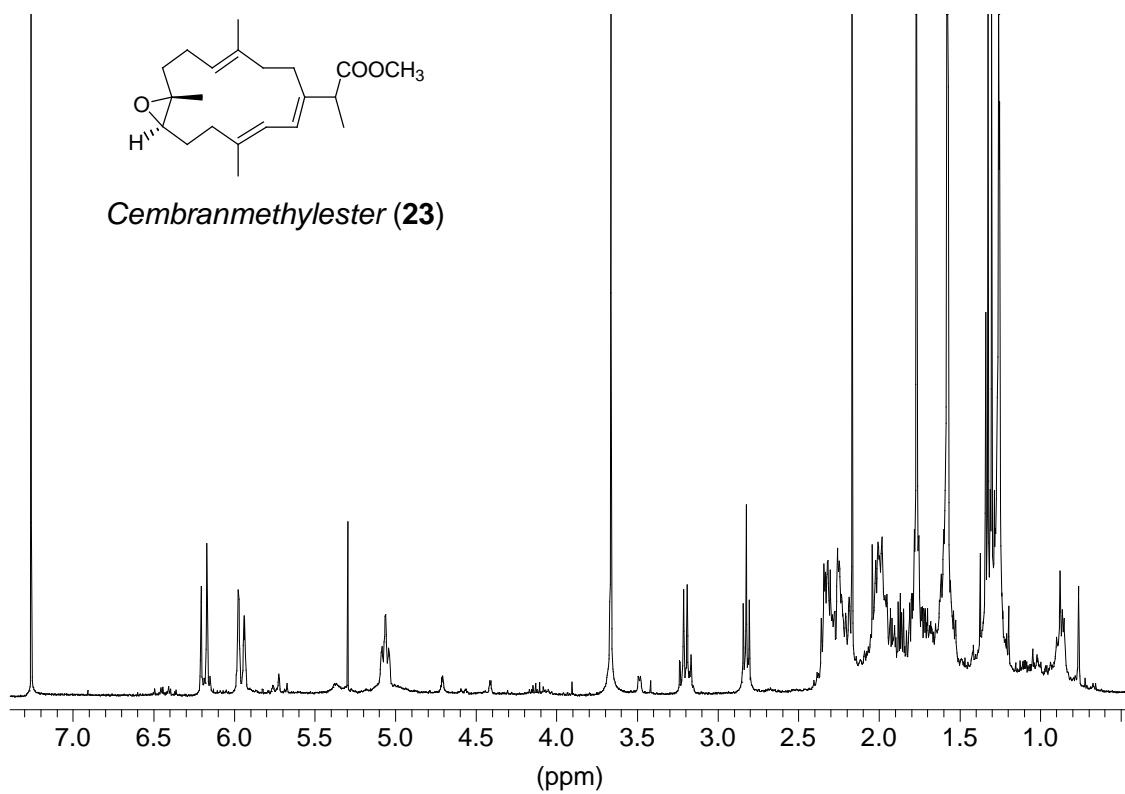
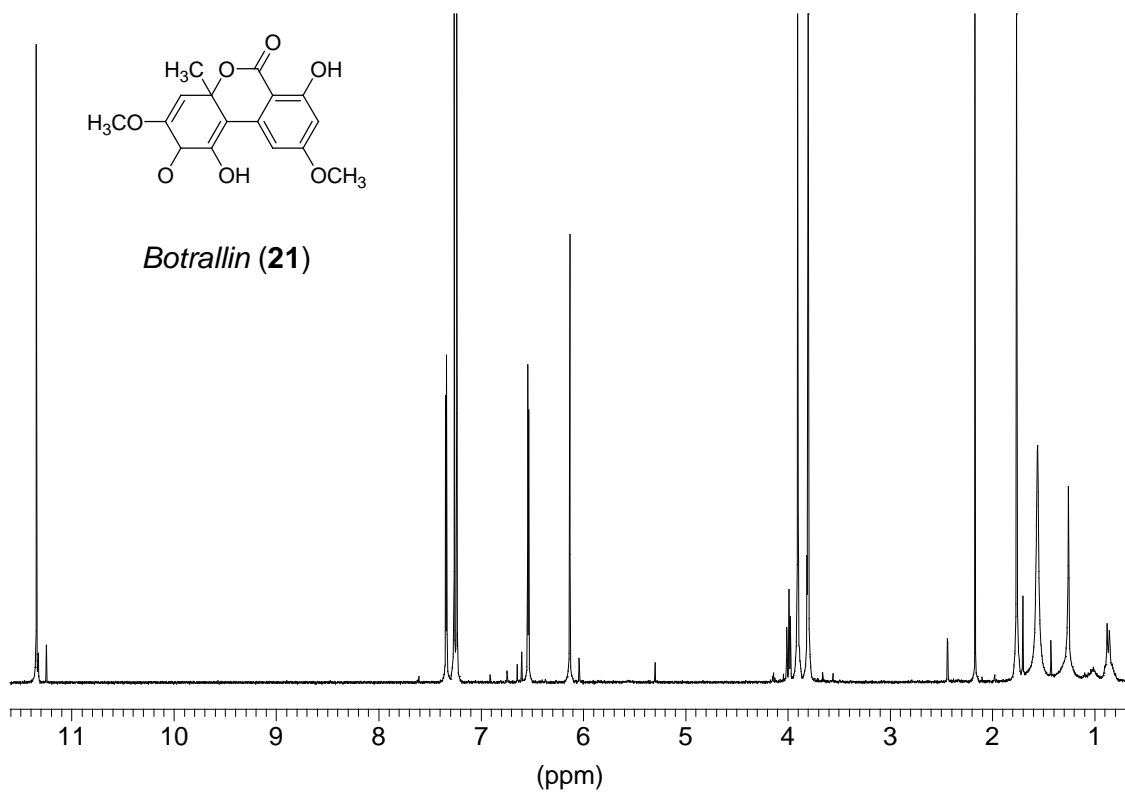


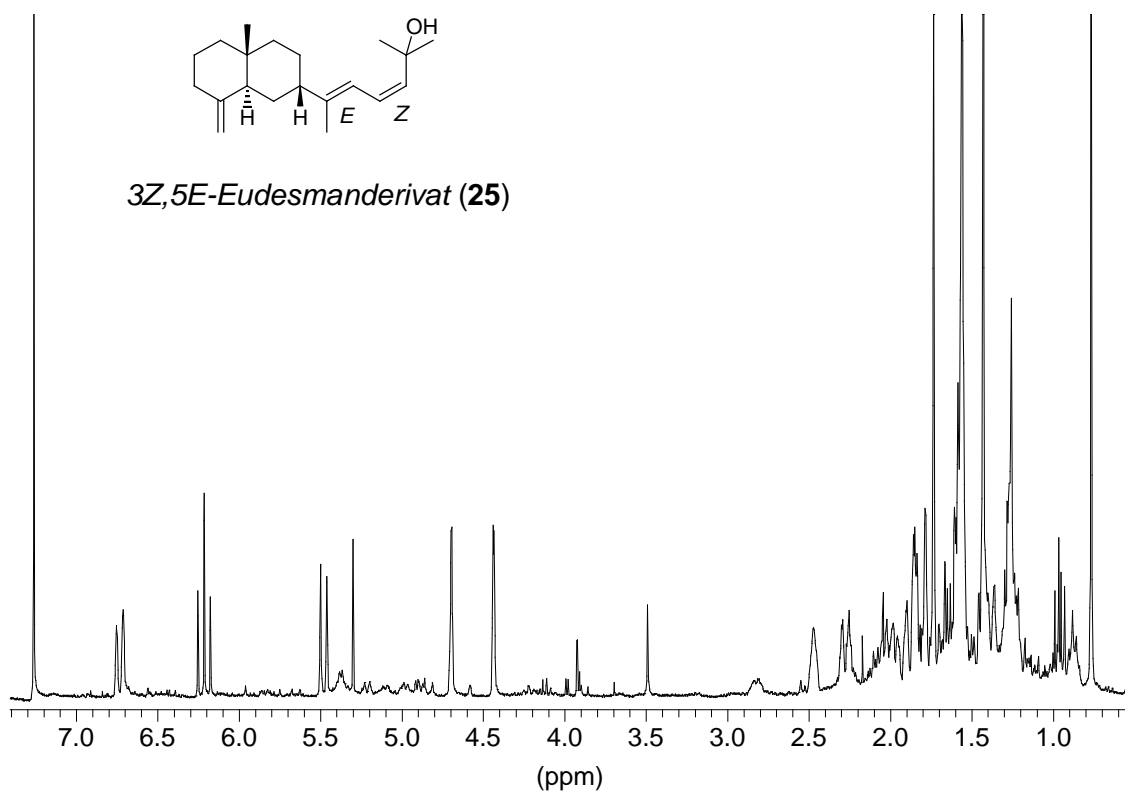
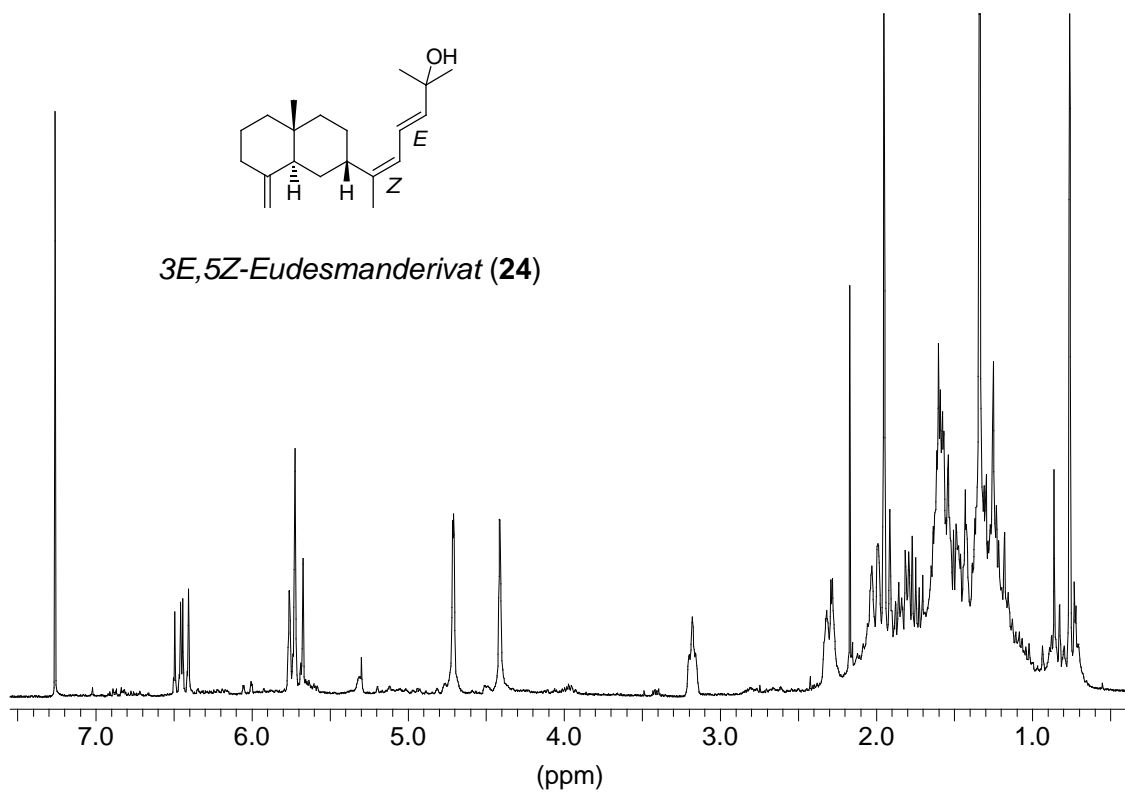


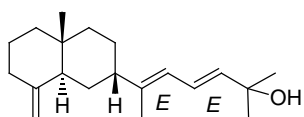




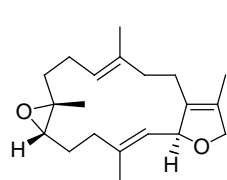
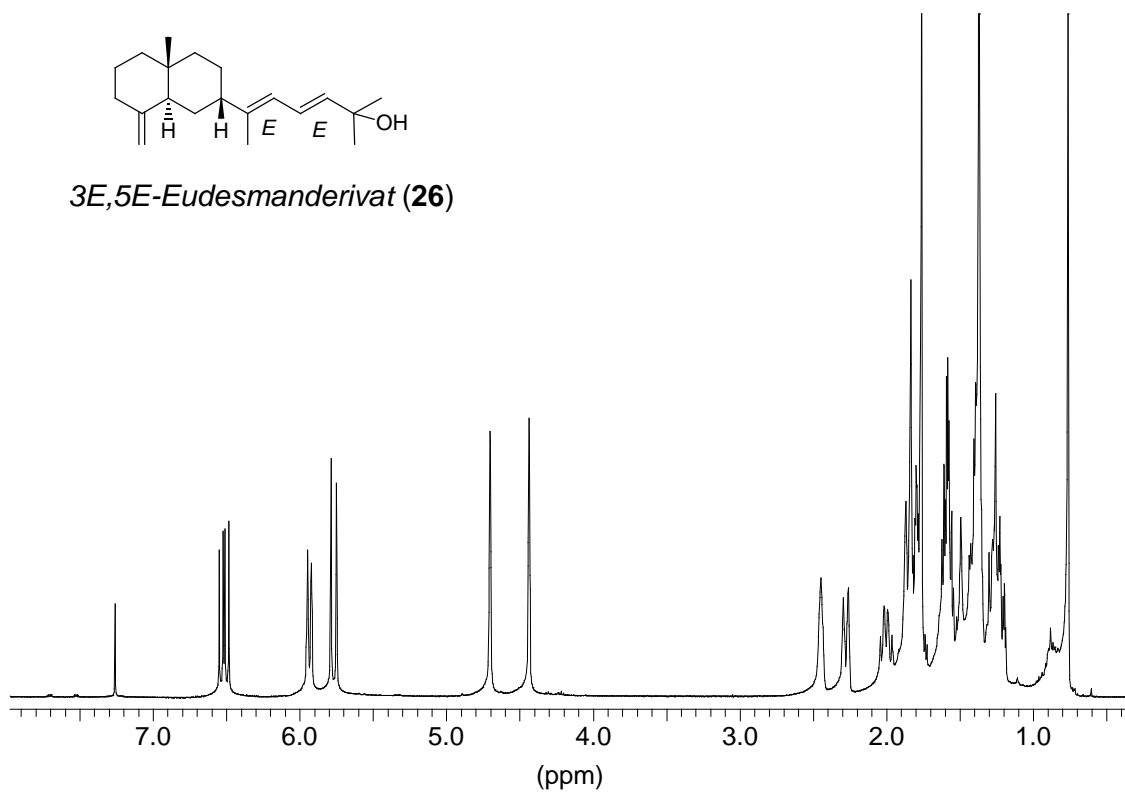
*Ulocladol (19)**Clonostachydiol (20)*



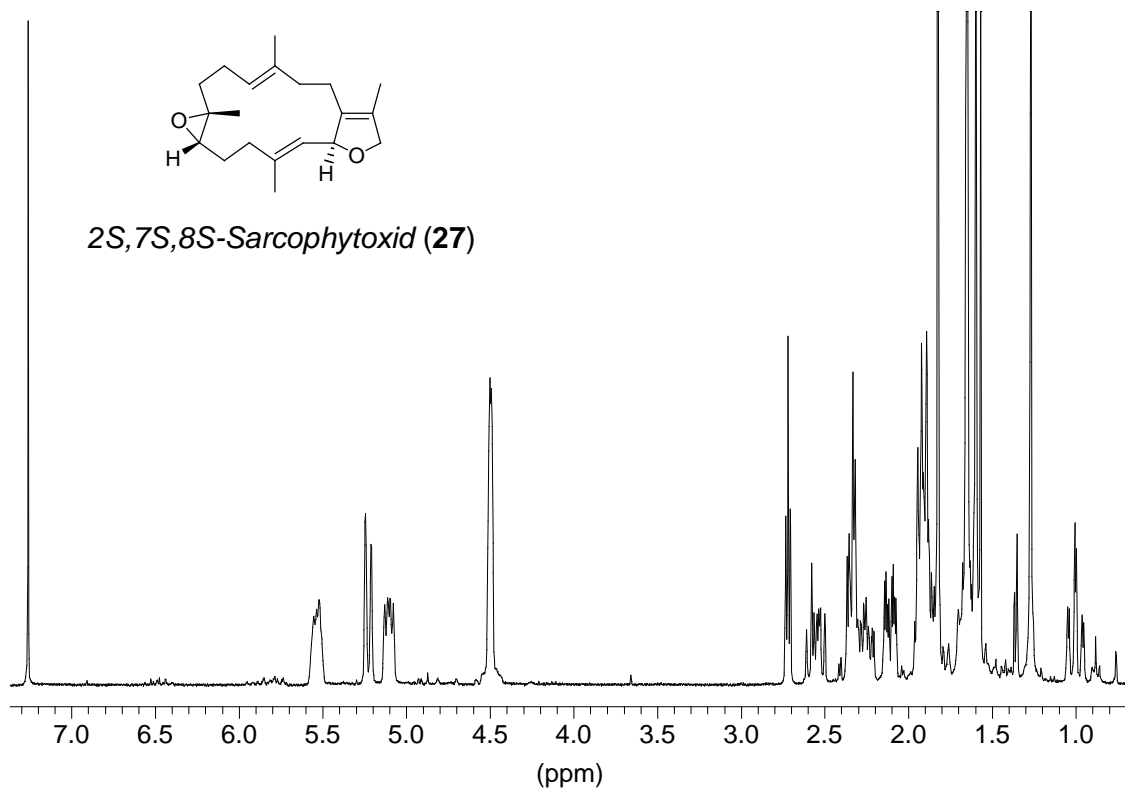




3E,5E-Eudesmanderivat (26)



2S,7S,8S-Sarcophytosid (27)



6.3 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

6.3.1 Tabellen

Tabelle 1: Aktivitäten der RTI aus Pflanzen	8
Tabelle 2: Aktivitäten der RTI aus Mikroorganismen	12
Tabelle 3: Aktivitäten der RTI aus Marinen Organismen	14
Tabelle 4: Aktivitäten der p56 ^{lck} -PTKI	19
Tabelle 5: Im HIV-1-RT- und p56 ^{lck} -PTK-Test untersuchte Reinsubstanzen	25
Tabelle 6: Positivkontrollen für HIV-1-RT- und p56 ^{lck} -PTK-Tests (2.4.1, 2.4.2)	41
Tabelle 7: Aktivität der Extrakte im HIV-1-RT-Test (2.4.1)	42
Tabelle 8: Aktivität der Extrakte im PTK-Test (2.4.2)	42
Tabelle 9: Algenextrakte mit RT- oder PTK-Hemmaktivität	44
Tabelle 10: Schwammextrakte mit RT- oder PTK-Hemmaktivität	44
Tabelle 11: Pilzisolat mit RT- oder PTK-Hemmaktivität	45
Tabelle 12: Extrakte von Spermatophyta mit RT- oder PTK-Hemmaktivität	45
Tabelle 13: Zusammenfassung der Aktivitäten von Reinsubstanzen im HIV-1-RT- und PTK-Test	47
Tabelle 14: HIV-1-RT- und PTK-Tests ausgewählter Tiere und Pilze	51
Tabelle 15: HIV-1-RT- und p56 ^{lck} -PTK-Hemmung durch Isodehydroluffariellolid (3), Homofascaplysin A (4) und Fascaplysin (5)	59
Tabelle 16: Antiplasmodiale Aktivität (IC ₅₀ -Werte) und Zytotoxizität (MIC) von Homofascaplysin A (4) und Fascaplysin (5):	60
Tabelle 17: ¹ H-NMR-Daten für die Sesterterpene 1 und 2	61
Tabelle 18: ¹³ C-NMR-Daten der Sesterterpene 1 und 2	62
Tabelle 19: ¹³ C-NMR- und ¹ H-NMR-Daten von Fascaplysin (5)	63
Tabelle 20: HIV-1-RT-Hemmung durch Halitoxin (6)	66
Tabelle 21: Antiplasmodiale Aktivität und Zytotoxizität von Halitoxin (6): IC ₅₀ -Werte	67
Tabelle 22: HIV-1-RT- und p56 ^{lck} -PTK-Hemmung durch Dictyodial (10)	72
Tabelle 23: ¹ H-NMR-Daten (300 MHz, CDCl ₃) von (23)-(25)	84
Tabelle 24: ¹³ C-NMR-Daten (75,5 MHz, CDCl ₃) für (23)-(25)	85
Tabelle 25: Herkunft der Makroorganismen und Cyanobakterien	99
Tabelle 26: Kennzeichnung der im Screening aktiven Arten / Gattungen	99

6.3.2 Abbildungen

Abbildung 1: Strukturformeln der HIV-1-RT-Hemmstoffe	49
Abbildung 2: Strukturformeln der p56 ^{lck} -PTK-Hemmstoffe	50
Abbildung 3: Fraktionierungsschema des Extraktes von <i>Gymnogongrus antarcticus</i>	52
Abbildung 4: Strukturformeln der aus <i>Hirtios</i> cf. <i>erecta</i> isolierten Verbindungen	53
Abbildung 5: Aus NMR-Daten abgeleitete Substrukturen I, II, III von Verbindung 1	54
Abbildung 6: Strukturelemente abgeleitet aus NMR-Daten von 1	56
Abbildung 7: Strukturelemente abgeleitet aus NMR-Daten von Fascaplysin (5)	58
Abbildung 8: Vorgeschlagener Biogeneseweg für 3-Alkylpyridin-Derivate (nach Ref. 178)	64
Abbildung 9: Strukturformel des aus <i>Xestospongia rosariensis</i> isolierten Halitoxins (6)	64
Abbildung 10: Pyridinderivate für HIV-1-RT-Tests	66
Abbildung 11: Strukturformeln der aus <i>Amphimedon</i> sp. isolierten Verbindungen	68
Abbildung 12: Strukturformeln der aus <i>Dictyota volubilis</i> isolierten Substanzen (10 - 17) und des Reduktionsproduktes Dictyodiol (18)	70
Abbildung 13: Strukturformeln der aus <i>Ulocladium botrytis</i> isolierten Substanzen	74
Abbildung 14: Strukturformel der aus <i>Epicoccum</i> sp. identifizierten Verbindung	75
Abbildung 15: Fraktionierungsschema des Extraktes von <i>U. botrytis</i>	76
Abbildung 16: Fraktionierungsschema des Extraktes von <i>Epicoccum</i> sp.	77
Abbildung 17: Strukturformeln der aus <i>Lobophytum crassum</i> isolierten Verbindungen	79
Abbildung 18: Strukturelemente abgeleitet aus NMR-Daten von 23	81
Abbildung 19: Doppelbindungskonfiguration der Eudesmanderivate 24 - 26	82

7 Literatur

- ¹ Potier, P. (1997) Spektrum der Wissenschaft, Spezial 6: Pharmaforschung, 6-8.
- ² Folkers, G., Kubinyi, H. (1997) Spektrum der Wissenschaft, Spezial 6: Pharmaforschung, 17-27.
- ³ Bugg, C. E., Carson, W. M., Montgomery, J. A. (1994) Spektrum der Wissenschaft, März, 30-36.
- ⁴ Plunkett, M. J., Ellman, J. A. (1997) Spektrum der Wissenschaft, Spezial 6: Pharmaforschung, 28-35.
- ⁵ Lozoya, X. (1997) Spektrum der Wissenschaft, Spezial 6: Pharmaforschung, 10-16.
- ⁶ Rinehart, K. L. (1988) Memoirs of the California Academy of Sciences, 13, 13-22.
- ⁷ Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J. (1991) Methods in Plant Biochemistry, 6, 47-69.
- ⁸ Bevan, P., Ryder, H., Shaw, I. (1995) Trends Biotechnol. 13, 115-121.
- ⁹ Lindequist, U., Kusnick, C., Helmholtz, H., Liberra, K. (1999) Zeitschrift für Phytotherapie, 20, 29-36.
- ¹⁰ Proksch, P. (1994) DAZ 134, 5069-5084.
- ¹¹ a) König, G. M., Wright, A. D. (1997) Pharmazie in unserer Zeit 26, 281-288. b) König, G. M. (1992) DAZ 132, 673-683.
- ¹² De Clercq, E. (1995) in: Anti-AIDS Drug Development: Challenges, Strategies and Prospects, (Mohan, P., Baba, M., Hrsg.), S. 1-37, Harwood Academic Publishers, Chur, Schweiz.
- ¹³ Balzarini, J., Pelemans, H., Karlsson, A., DeClerq, E., Kleim, J.-P. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13152-13157.
- ¹⁴ Lipsky, J. J. (1996) Lancet 348, 800-803.
- ¹⁵ Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R. G., Boyer, P. L., Hughes, S. H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P. A. J., Arnold, E. (1994) J. Mol. Biol. 243, 369-387.
- ¹⁶ Vlietinck, A. J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L. A. (1998) Planta Med. 64, 97-109.
- ¹⁷ Ng, T. B., Huang, B., Fong, W. P., Yeung, H. W. (1997) Life Sci. 61, 933-949.
- ¹⁸ Kinghorn, D. A. (1995) in: Anti-AIDS Drug Development: Challenges, Strategies and Prospects, (Mohan, P., Baba, M., Hrsg.), S. 211-237, Harwood Academic Publishers, Chur, Schweiz.
- ¹⁹ Matthée, G., Wright, A. D., König, G. M. (1999) Planta Med., im Druck.
- ²⁰ De Rudder, J., Privat de Garilhe, M. (1966) Antimicrob. Agents Chemother. 1965/1966, 578-584.
- ²¹ Bergmann, W., Burke, D. C. (1955) J. Org. Chem. 21, 226-228.
- ²² Furman, P. A., Fyfe, J. A., St. Clair, M. H., Weinhold, K., Rideout, J. L., Freeman, G. A., Nusinoff Lehrman, S., Bolognese, D. P., Broder, S., Mitsuya, H., Barry, D. W. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8333-8337.

- ²³ Merluzzi, V. J., Hargrave, K. D., Labadia, M., Grozinger, K., Skoog, M., Wu, J. C., Shih, C., Echner, K., Hattox, S., Adams, J., Rosethal, A. S., Faanes, R., Eckner, R. J., Koup, R. A., Sullivan, J. L. (1990) *Science* 250, 1411-1413.
- ²⁴ Kashman, Y., Gustafson, K. R., Fuller, R. W., Cardellina II, J. H., McMahon, J. B., Currens, M. J., Buckheit, R. W., Hughes, S. H., Cragg, G. M., Boyd, M. R. (1992) *J. Med. Chem.* 35, 2735-2743.
- ²⁵ Galinis, D. L., Fuller, R. W., McKee, T. C., Cardellina II, J. H., Gulakowski, R. J., McMahon, J. B., Boyd, M. R. (1996) *J. Med. Chem.* 39, 4507-4510.
- ²⁶ Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S., Johnson, K. A. (1995) *Science* 267, 988-993.
- ²⁷ Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A., Steitz, T. A. (1992) *Science* 256, 1783-1790.
- ²⁸ Litvak, S. (1996) in: *Retroviral Reverse Transcriptase*, S. 161-197, Springer Verlag, Heidelberg und dort zitierte Referenzen.
- ²⁹ Patil, A. D., Freyer, A. J., Eggleston, D. S., Haltiwanger, R. C., Bean, M. F., Taylor, P. B., Caranfa, M. J., Breen, A. L., Bartus, H. R., Johnson, R. K., Hertzberg, R. P., Westley, J. W. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 4131-4138.
- ³⁰ McKee, T. C., Covington, C. D., Fuller, R. W., Bokesch, H. R., Young, S., Cardellina II, J. H., Kadushin, M. R., Soejarto, D. D., Stevens, P. F., Cragg, G. M., Boyd, M. R. (1998) *J. Nat. Prod.* 61, 1252-1256.
- ³¹ Fuller, R. W., Bokesch, H. R., Gustafson, K. R., McKee, T. C., Cardellina II, J. H., McMahon, J. B., Cragg, G. M., Soejarto, D. D., Boyd, M. R. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4, 1961-1964.
- ³² Pengsuparp, T., Serit, M., Hughes, S. H., Soejarto, D. D., Pezzuto, J. M. (1996) *J. Nat. Prod.* 59, 839-842.
- ³³ Dharmaratne, H. R. W., Wanigasekera, W. M. A. P., Mata-Greenwood, E., Pezzuto, J. M. (1998) *Planta Med.* 64, 460-461.
- ³⁴ Chenera, B., West, M. L., Finkelstein, J. A., Dreyer, G. B. (1993) *J. Org. Chem.* 58, 5605-5606.
- ³⁵ Deshpande, P. P., Tagliaferri, F., Victory, S. F., Yan, S., Baker, D. C. (1995) *J. Org. Chem.* 60, 2964-2965.
- ³⁶ Flavin, M. T., Rizzo, J. D., Khilevich, A., Kucherenko, A., Sheinkman, A., Vilaychak, V., Lin, L., Chen, W., Greenwood, E. M., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Hughes, S. H., Flavin, T. M., Cibulski, M., Boulanger, W. A., Shone, R. L., Xu, Z. (1996) *J. Med. Chem.* 39, 1303-1313.
- ³⁷ Boyd, M. R., Hallock, Y. F., Cardellina II, J. H., Manfredi, K. P., Blunt, J. W., McMahon, J. B., Buckheit, Jr., R. W., Bringman, G., Schäffer, M., Cragg, G. M., Thomas, D. W., Jato, J. G. (1994) *J. Med. Chem.* 37, 1740-1745.

- ³⁸ McMahon, J. B., Currens, M. J., Gulakowski, R. J., Buckheit, Jr., R. W., Lackman-Smith, C., Hallock, Y. F., Boyd, M. R. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 484-488.
- ³⁹ Schinazi, R. F., Chu, C. K., Babu, J. R., Oswald, B. J., Saalman, V., Cannon, D. L., Eriksson, B. F. H., Nasr M. (1990) *Antiviral Res.* 13, 265-272.
- ⁴⁰ Higuchi, H., Mori, K., Kato, A., Ohkuma, T., Endo, T., Kaji, H., Kaji, A. (1991) *Antiviral Res.* 15, 205-216.
- ⁴¹ Lavie, G., Valentine, F., Levin, B., Mazur, Y., Gallo, G., Lavie, D., Weiner, D., Meruelo, D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5963-5967.
- ⁴² Lenard, J., Rabson, A., Vanderoef, R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 158-162.
- ⁴³ Kakiuchi, N., Hattori, M., Namba, T., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Okuda, T. (1985) *J. Nat. Prod.* 48, 614-621.
- ⁴⁴ Spedding, G., Ratty, A., Middleton, Jr., A. (1989) *Antiviral Res.* 12, 99-110.
- ⁴⁵ Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J., Barré-Sinoussi, F. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190, 469-476.
- ⁴⁶ Kusumoto, I. T., Hattori, M., Miyaichi, Y., Tomimori, T., Hanaoka, M., Namba, T. (1991) *Shoyakugaku Zasshi*, 45, 240-254.
- ⁴⁷ Tan, G. T., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., Hughes, S. H. (1991) *J. Nat. Prod.* 54, 143-154.
- ⁴⁸ Tan, G. T., Miller, J. F., Kinghorn, A. D., Hughes, S. H., Pezzuto, J. M. (1992) *Biochem Biophys. Res. Comm.* 185, 370-378.
- ⁴⁹ Ono, K., Nakane, H., Zeng-Mu, M., Ose, Y., Sakai, Y., Mizuno, M. (1989) *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1810-1812.
- ⁵⁰ Nonaka, G., Nishioka, I., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Parker, W. B., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y., Lee, K.-H. (1990) *J. Nat. Prod.* 53, 587-595.
- ⁵¹ Ogata, T., Higuchi, H., Mochida, S., Matsumoto, H., Kato, A., Endo, T., Kaji, A., Kaji, H. (1992) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8, 1937-1944.
- ⁵² Kilkuskie, R. E., Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Bodner, A. J., Cheng, Y., Lee, K.-H. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1529-1534.
- ⁵³ Musci, I., Prágai, B. M. (1985) *Experientia* 41, 930-931.
- ⁵⁴ Sethi, V. S., Sethi, M. L. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 63, 1070-1076.
- ⁵⁵ Sethi, M. (1979) *J. Nat. Prod.* 42, 187-196.
- ⁵⁶ Sethi, M. (1983) *J. Pharm. Sci.* 72, 538-541.
- ⁵⁷ Tan, G. T., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., Hughes, S. H. (1991) *J. Nat. Prod.* 54, 143-154.

- ⁵⁸ Tan, G. T., Miller, J. F., Kinghorn, A. D., Hughes, S. H., Pezzuto, J. M. (1992) *Biochem Biophys. Res. Comm.* 185, 370-378.
- ⁵⁹ McCormick, J. L., McKee, T. C., Cardellina, II, J. H., Boyd, M. R. (1996) *J. Nat. Prod.* 59, 469-471.
- ⁶⁰ MacRae, W. D., Hudson, J. B., Towers, G. H. N. (1989) *Planta Med.* 55, 531-535.
- ⁶¹ Charlton, J. L. (1998) *J. Nat. Prod.* 61, 1447-1451.
- ⁶² Fujihashi, T., Hara, H., Sakata, T., Mori, K., Higuchi, H., Tanaka, A., Kaji, H., Kaji, A. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2000-2007.
- ⁶³ Hara, H., Fujihashi, T., Sakata, T., Kaji, A., Kaji, H. (1997) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 13, 695-705.
- ⁶⁴ Lingham, R. B., Hsu, A. H. H. M., O'Brien, J. A., Sigmund, J. M., Sanchez, M., Gagliardi, M. M., Heimbuch, B. K., Genilloud, O., Maring, I., Diez, M. T., Hirsch, C. F., Zink, D. L., Liesch, J. M., Koch, G. E., Gartner, S. E., Garrity, G. M., Tsou, N. N., Salituro, G. M. (1996) *J. Antibiotics* 49, 253-259.
- ⁶⁵ Ohkuma, H., Sakai, F., Nishiyama, Y., Ohbayashi, M., Imanishi, H., Konishi, M., Miyake, T., Koshiyama, H., Kawaguchi, H. (1980) *J. Antibiotics* 33, 1087-1097.
- ⁶⁶ Take, Y., Inouye, Y., Nakamura, S., Allaudeen, H. S., Kubo, A. (1989) *J. Antibiotics* 42, 107-115.
- ⁶⁷ Althaus, I. W., Franks, K. M., Langley, K. B., Kezdy, F. J., Peterson, T., Buxser, S. E., Decker, D. E., Dolak, L. A., Ulrich, R. G., Reusser, F. (1996) *Experientia* 52, 329-335.
- ⁶⁸ Lau, A. F., Siedlecki, J., Anleitner, J., Patterson, G. M. L., Caplan, F. R., Moore, R. E. (1993) *Planta Med.* 59, 148-151.
- ⁶⁹ Falch, B. S., König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O., Angerhofer, C. K., Pezzuto, J. M., Bachmann, H. (1995) *Planta Med.* 61, 321-328.
- ⁷⁰ Falch, B. S., König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O., Rüegger, H., Bernardinelli, G. (1993) *J. Org. Chem.* 58, 6570-6575.
- ⁷¹ Gustafson, K. R., Cardellina II, J. H., Fuller, R. W., Weislow, O. S., Kiser, R. F., Snader, K. M., Patterson, G. M. L., Boyd, M. R. (1989) *J. Nat. Cancer Inst.* 81, 1254-1258.
- ⁷² Anke, T., Erkel, G., Kocksch, G., Kuschel, A., Gimenez, A., Velten, R., Steglich, W. (1993) in: *Wege zu neuen Produkten und Verfahren der Biotechnologie*, (Anke, T., Onken, U., Hrsg.), S. 15-25, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- ⁷³ Erkel, G., Anke, T., Velten, R., Steglich, W. (1991) *Z. Naturforsch.* 46c, 442-450.
- ⁷⁴ Erkel, G., Anke, T., Gimenez, A., Steglich, W. (1992) *J. Antibiotics* 45, 29-37
- ⁷⁵ Kuschel, A., Anke, T., Velten, R., Klostermeyer, D., Steglich, W., König, B. (1994) *J. Antibiotics* 47, 733-739.

- ⁷⁶ Arai, K., Masuda, K., Kiriya, N., Nitta, K., Yamamoto, Y., Shimizu, S. (1981) *Chem. Pharm. Bull.* 29, 961-969.
- ⁷⁷ Ono, K., Nakane, H., Shimizu, S., Koshimura, S. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 174, 56-62.
- ⁷⁸ Loya, S., Hizi, A. (1990) *FEBS Letters* 269, 131-134.
- ⁷⁹ Hirsch, S., Rudi, A., Kashman, Y., Loya, Y. (1991) *J. Nat. Prod.* 54, 92-97.
- ⁸⁰ Loya, S., Tal, R., Kashman, Y., Hizi, A. (1990) *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2009-2012.
- ⁸¹ Talpir, R., Rudi, A., Kashman, Y., Loya, Y., Hizi, A. (1994) *Tetrahedron* 50, 4179-4184.
- ⁸² Loya, S., Tal, R., Hizi, A., Issacs, S., Kashman, Y., Loya, Y. (1993) *J. Nat. Prod.* 56, 2120-2125.
- ⁸³ Ishiyama, H., Ishibashi, M., Ogawa, A., Yoshida, S., Kobayashi, J. (1997) *J. Org. Chem.* 62, 3831-3836.
- ⁸⁴ Isaacs, S., Kashman, Y., Loya, S., Hizi, A., Loya, Y. (1993) *Tetrahedron* 49, 10435-10438.
- ⁸⁵ Loya, S., Rudi, A., Tal, R., Kashman, Y., Loya, Y., Hizi, A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 309, 315-322.
- ⁸⁶ Jimenez, C., Quinoa, E., Adamczeski, M., Hunter, L. M., Crews, P. (1991) *J. Org. Chem.* 56, 3403-3410.
- ⁸⁷ Inman, W. D., O'Neill-Johnson, M., Crews, P. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1-4.
- ⁸⁸ Loya, S., Kashman, Y., Hizi, A. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 293, 208-212.
- ⁸⁹ Tymiak, A. A., Rinehart, Jr., K. L. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105, 7396-7401.
- ⁹⁰ Silvestri, I., Albonici, L., Ciotti, M., Lombardi M. P., Sinibaldi, P., Manzanri, V., Orlando, P., Carretta, F., Strazzullo, G., Grippo, P. (1995) *Experientia* 51, 1076-1080.
- ⁹¹ Orlando, P., Strazzullo, G., Carretta, F., De Falco, M., Grippo, P. (1996) *Experientia* 52, 812-817.
- ⁹² Richards J. T., Kern, E. R., Glasgow, L. A., Overall, Jr., J. C., Deign, E. F., Hatch, M. T. (1978) *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 24-30.
- ⁹³ Hayashi, K., Hamada, J., Hayashi, T. (1996) *Phytother. Res.* 10, 233-237.
- ⁹⁴ Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., Yamamoto, N. (1987) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113, 413-416.
- ⁹⁵ Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., Yamamoto, N. (1987) *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1524-1528.
- ⁹⁶ Cardellina II, J. H., Munro, M. H. G., Fuller, R. W., Manfredi, K. P., McKee, T. C., Tischler, M., Bokesch, H. R., Gustafson, K. R., Beutler, J. A., Boyd, M. R. (1993) *J. Nat. Prod.* 56, 1123-1129.

- ⁹⁷ Ohta, K., Mizushina, Y., Hirata, N., Takemura, M., Sugawara, F., Matsukage, A., Yoshida, S., Sakaguchi, K. (1998) *Chem. Pharm. Bull.* 46, 684-686.
- ⁹⁸ Ninomiya, M., Matsuie, S., Kawakubo, A., Mifji, N. (1994) Japanese Patent JP 75839, Apr. 14. 94.
- ⁹⁹ Levitzki, A., Gazit, A. (1995) *Science* 267, 1782-1788.
- ¹⁰⁰ Bolen, J. B., Brugge, J. S. (1997) *Ann. Rev. Immunol.* 15, 371-404.
- ¹⁰¹ Danielian, S. (1993) *Pathologie - Biologie* 41, 619-635.
- ¹⁰² Lawrence, D. S., Niu, J. (1998) *Pharmacol. Ther.* 77, 81-114.
- ¹⁰³ Weil, R., Veillette, A. (1996) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 205, 63-87.
- ¹⁰⁴ Hanks, S. K., Hunter, T. (1995) in: *The Protein Kinase FactsBook Protein-Tyrosine Kinases*, (Hardie, G., Hanks, S, Hrsg.), S. 7-47, Academic Press, London, England.
- ¹⁰⁵ Klohs, W. D., Fry, D. W., Kraker, A. J. (1997) *Curr. Opin. Oncol.* 9, 562-568.
- ¹⁰⁶ Chang, C., Geahlen, R. L. (1992) *J. Nat. Prod.* 55, 1529-1560.
- ¹⁰⁷ Burke, T. R. (1992) *Drugs of the Future* 17, 119-131.
- ¹⁰⁸ Cushman, M., Nagarathnam, D., Geahlen, R. L. (1991) *J. Nat. Prod.* 54, 1345-1352.
- ¹⁰⁹ Geahlen, R. L., McLaughlin, J. L. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165, 241-245.
- ¹¹⁰ Thakkar, K., Geahlen, R. L., Cushman, M. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 2950-2955.
- ¹¹¹ Padmanabha, R., Shu, Y., Cook, L. S., Veitch, J. A., Donovan, M., Lowe, S., Huang, S., Pirnik, D., Manly, S. P. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 569-574.
- ¹¹² Nonomura, S. (1955) *J. Pharm. Soc. Jpn.* 75, 219-227.
- ¹¹³ Faltynek, C. R., Schroeder, J., Mauvais, P., Miller, D., Wang, S., Murphy, D., Lehr, R., Kelley, M., Maycock, A., Michne, W., Miski, M., Thunberg, A. L. (1995) *Biochemistry*, 34, 12404-12410.
- ¹¹⁴ Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brisette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., Connelly, P. A. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 695-701.
- ¹¹⁵ Bullington, J. L., Cameron, J. C., Davis, J. E., Dodd, J. H., Harris, C. A., Henry, J. R., Pellegrino-Gensey, J. L., Rupert, K. C., Siekierka, J. J. (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 2489-2494.
- ¹¹⁶ Schlösser, U. G. (1994) *Bot. Acta* 107, 113-186.
- ¹¹⁷ Höller, U., Dissertation, Braunschweig, 1999.
- ¹¹⁸ Goclik, E., König, G. M., Wright, A. D. (1999) in Vorbereitung.
- ¹¹⁹ Wessels, M., König, G. M., Wright, A. D. (1999) in Vorbereitung.
- ¹²⁰ De Nys, R., Wright, A. D., König, G. M., Sticher, O. (1993) *Tetrahedron* 49, 11213.
- ¹²¹ Wright, A. D., König, G. M., Sticher, O. (1990) *Tetrahedron* 46, 3851-3858.
- ¹²² König, G. M., Wright, A. D., Fronczek, F. R. (1994) *J. Nat. Prod.* 57, 1529-1538.
- ¹²³ König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O. (1991) *Phytochemistry* 30, 3679.

- ¹²⁴ König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O. (1991) *Tetrahedron* 47, 1399.
- ¹²⁵ König, G. M., Wright, A. D. (1997) *J. Nat. Prod.* 60, 967-970.
- ¹²⁶ König, G. M., Wright, A. D. (1997) *Planta Med.* 63, 186-187.
- ¹²⁷ König, G. M., Wright, A. D., De Nys, R. (1999) *J. Nat. Prod.* 62, 383-385.
- ¹²⁸ König, G. M., Wright, A. D., Linden, A. (1999) *Phytochemistry*, im Druck.
- ¹²⁹ Wessels, M., König, G. M., Wright, A. D. (1999) *J. Nat. Prod.*, akzeptiert.
- ¹³⁰ Angerhofer, C. K., König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O., Pezzuto, J. M. (1992) *J. Nat. Prod.* 55, 1787-1789.
- ¹³¹ König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O. (1992) *J. Nat. Prod.* 55, 633.
- ¹³² König, G. M., Wright, A. D., Angerhofer, C. K. (1996) *J. Org. Chem.* 61, 3259-3267.
- ¹³³ Goclik, E., König, G. M., Wright, A. D. (1999) *Arquipelago, Bulletin of the University of the Azores, Life and Marine Sciences*, akzeptiert.
- ¹³⁴ Goclik, E., König, G. M., Wright, A. D. (1999) in Vorbereitung.
- ¹³⁵ Wegner, C., König, G. M., Wright, A. D. (1999) in Vorbereitung.
- ¹³⁶ Höller, U., König, G. M., Wright, A. D. (1999) *J. Nat. Prod.* 62, 114-118.
- ¹³⁷ Höller, U., König, G. M., Wright, A. D. (1999) *Eur. J. Org. Chem.*, akzeptiert.
- ¹³⁸ Grabley, S., Hammann, P., Thiericke, R., Wink, J., Philipps, S., Zeeck, A. (1993) *J. Antibiotics*, 46, 343-345.
- ¹³⁹ König, G. M., Wright, A. D. (1999) *Phytochem. Anal.*, im Druck.
- ¹⁴⁰ Eberle, J., Seibl, R. (1992) *J. Virol. Methods* 40, 347-356.
- ¹⁴¹ Schulz, B., Sucker, J., Aust, H. J., Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P. G., Döring, D. (1995) *Mycol. Res.* 99, 1007-1015.
- ¹⁴² Mosmann, T. (1983) *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- ¹⁴³ Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Ruangrunsi, N., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M. (1993) *J. Nat. Prod.* 56, 30-38.
- ¹⁴⁴ Desjardins, R. E., Canfield, C. J., Haynes, J. D., Chulay, J. D. (1979) *Antimicrob. Agents Chemother.* 16, 710-718.
- ¹⁴⁵ Ridley, R. G., Hofheinz, W., Matile, H., Jaquet, C., Dorn, A., Masciadri, R., Jolidon, S., Richter, W. F., Guenzi, A., Girometta, M.-A., Urwyler, H., Huber, W., Thaithong, S., Peters, W. (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1846-1854.
- ¹⁴⁶ Angerhofer, C. K., König, G. M., Wright, A. D., Sticher, O., Milhous, W. K., Cordell, G. A., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M. (1992) in: *Advances in Natural Product Chemistry*, (Atta-ur-Rahman, Hrsg.), S. 311-329, Harwood Academic Publishers, Chur, Schweiz.
- ¹⁴⁷ Rätz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R., Brun, R. (1997) *Acta Trop.* 68, 139-147.
- ¹⁴⁸ Kaminsky, R., Brun, R. (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2858-2862.

- ¹⁴⁹ Bax, A., Subramanian, S. (1986) *J. Mag. Res.* 67, 565-569.
- ¹⁵⁰ Bax, A., Summers, M. F. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 2093-2094.
- ¹⁵¹ Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D., Jeanloz, R. W. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 811-813.
- ¹⁵² Bax, A., Davis, D. G. (1985) *J. Mag. Res.* 63, 207-213.
- ¹⁵³ Gonzalez, A. G., Daries, J., Martin, J. D. (1973) *Tetrahedron Lett.* 37, 3625-3626.
- ¹⁵⁴ de Nys, R., Coll, J. C., Bowden, B. F. (1992) *Aust. J. Chem.* 45, 1625.
- ¹⁵⁵ Finer, J., Clardy, J., Fenical, W., Minale, L., Riccio, R., Battaile, J., Kirkup, M., Moore, R. E. (1979) *J. Org. Chem.* 44, 2044-2047.
- ¹⁵⁶ Kazlauskas, R., Murphy, P. T., Wells, R. J., Blount, J. F. (1980) *Tetrahedron Lett.* 21, 315.
- ¹⁵⁷ Schmitz, F. J., Hollenbeak, K. H., Campbell, D. C. (1978) *J. Org. Chem.* 43, 3916-3922.
- ¹⁵⁸ Miyagawa, H., Nagai, S., Tsurushima, T., Sato, M., Ueno, T., Fukami, H. (1994) *Biosci. Biotech. Biochem.* 58, 1143-1145.
- ¹⁵⁹ Faulkner, D. J. (1998) *Nat. Prod. Rep.* 113-158.
- ¹⁶⁰ Ireland, C. M., Copp, B. R., Foster, M. P., McDonald, L. A., Radisky, D. C., Swersey, J. C. (1993) in: *Marine Biotechnology, Volume 1, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, (Attaway, D. H., Zaborsky, O. R., Hrsg.), S. 1-43, Plenum Press, New York, London.
- ¹⁶¹ De Silva, E. D., Scheuer, P. (1980) *Tetrahedron Lett.* 21, 1611-1614.
- ¹⁶² Bourget-Kondracki, M. L., Martin, M. T., Guyot, M. (1996) *Tetrahedron Lett.* 37, 3457-3460.
- ¹⁶³ Iguchi, K., Shimada, Y., Yamada, Y. (1992) *J. Org. Chem.* 57, 522-524.
- ¹⁶⁴ Ryu, G., Matsunaga, S., Fusetani, N. (1996) *J. Nat. Prod.* 59, 515-517.
- ¹⁶⁵ Kobayashi, M., Aoki, S., Sakai, H., Kawazoe, K., Kihara, N., Sasaki, T., Kitagawa, I. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 2795-2798.
- ¹⁶⁶ Kobayashi, M., Aoki, S., Gato, K., Kitagawa, I., (1996) *Chem. Pharm. Bull.* 44, 2142-2149.
- ¹⁶⁷ Roll, D. M., Ireland, C. M., Lu, H. S. M., Clardy, J. (1988) *J. Org. Chem.* 53, 3276-3278.
- ¹⁶⁸ Couperus, P. A., Clague, A. D. H., van Dongen, J. P. C. M. (1976) *Org. Magn. Reson.* 8, 426-431.
- ¹⁶⁹ Cimino, G., De Stefano, S., Guerriero, A., Minale, L. (1975) *Tetrahedron Lett.* 17, 1417-1420.
- ¹⁷⁰ Jimenez, C., Quinoa, E., Crews, P. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 1843-1846.
- ¹⁷¹ Quirante, J., Escolano, C., Merino, A., Bonjoch, J. (1998) *J. Org. Chem.* 63, 968-976.
- ¹⁷² Shoji, N., Umeyama, A., Shin, K., Takeda, K., Arihara, S., Kobayashi, J., Takei, M. (1992) *J. Org. Chem.* 57, 2996-2997.
- ¹⁷³ Patil, A. D., Kokke, W. C., Cochran, S., Francis, T. A., Tomszek, T., Westley, J. W. (1992) *J. Nat. Prod.* 55, 1170-1177.

- ¹⁷⁴ Edrada, R. A., Proksch, P., Wray, V., Christ, R., Witte, L., Van Soest, R. W. M. (1996) *J. Nat. Prod.* 59, 973-976.
- ¹⁷⁵ Edrada, R. A., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., Müller, W. E. G., Van Soest, R. W. M. (1996) *J. Nat. Prod.* 59, 1056-1060.
- ¹⁷⁶ Nakagawa, M., Endo, M., Tanaka, N., Gen-Pei, L. (1984) *Tetrahedron Lett.* 25, 3227-3230.
- ¹⁷⁷ Rodríguez, J., Crews, P. (1994) *Tetrahedron Lett.* 30, 4719-4722.
- ¹⁷⁸ Andersen, R. J., Van Soest, R. W. M., Kong, F. (1996) in: *Alkaloids: Chemical & Biological Perspectives*, Vol. 10 (Pelletier, S. W., Hrsg.), S. 301-356, Elsevier Science Ltd., Oxford, Großbritannien.
- ¹⁷⁹ Schmitz, F. J., Hollenbeak, K. H., Campbell, D. C., (1978) *J. Org. Chem.* 43, 3916-3922.
- ¹⁸⁰ Berlinck, R. G. S., Ogawa, C. A., Almeida, A. M. P., Sanchez, M. A. A., Malpezzi, E. L. A., Costa, L. V., Hajdu, E., de Freitas J. C. (1996) *Comp. Biochem. Physiol.* 115C, 155-163.
- ¹⁸¹ Sepčić, K., Guella, G., Mancinci, I., Pietra, F., Della Serra, M., Menestrina, G., Tubbs, K., Maček, P., Rutk, T. (1997) *J. Nat. Prod.* 60, 991-996.
- ¹⁸² Welsh, J. H., Prock, P. B. (1958) *Biol. Bull.* 115, 551-561.
- ¹⁸³ Beers, J. R. (1967) *Comp. Biochem. Physiol.* 21, 11-21.
- ¹⁸⁴ Jahn, T., König, G. M., Wright, A. D. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 3883-3884.
- ¹⁸⁵ Kobayashi, J., Tsuda, M., Kawasaki, N., Matsumoto, K., Adachi, T. (1994) *Tetrahedron Lett.* 35, 4383-4386.
- ¹⁸⁶ Tsuda, M., Kawasaki, N., Kobayashi, J. (1994) *Tetrahedron* 50, 7957-7960.
- ¹⁸⁷ Tsuda, M., Watanabe, D., Kobayashi, J. (1998) *Tetrahedron Lett.* 39, 1207-1210.
- ¹⁸⁸ Albrizio, S., Ciminiello, P., Fatturoso, E., Magno, S., Pawlik, J. R. (1995) *J. Nat. Prod.* 58, 647-652.
- ¹⁸⁹ in: *The Aldrich Library of NMR Spectra* (1983), Edition II, Vol. 2, Aldrich Chemical Company, Inc.
- ¹⁹⁰ in: Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1995) *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, S. 185-201, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- ¹⁹¹ Faulkner, J. D. (1999) *Nat. Prod. Rep.* 16, 155-198.
- ¹⁹² Faulkner, J. D. (1984) *Nat. Prod. Rep.* 1, 251-280.
- ¹⁹³ Faulkner, J. D. (1984) *Nat. Prod. Rep.* 1, 551-598.
- ¹⁹⁴ Finer, J., Clardy, J., Fenical, W., Minale, L., Riccio, R., Battaile, J., Kirkup, M., Moore, R. E. (1979) *J. Org. Chem.* 44, 2046-2047.
- ¹⁹⁵ Ishitsuka, M. O., Kusumi, T., Kakisawa, H., (1988) *J. Org. Chem.* 53, 5010-5013.
- ¹⁹⁶ Hardt, I. H., Fenical, W., Cronin, G., Hay, M. E. (1996) *Phytochemistry* 43, 71-73.
- ¹⁹⁷ Kerr, R. G., Baker, B. J. (1991) *Nat. Prod. Rep.* 8, 465-497.

- ¹⁹⁸ Ireland, C., Faulkner, D. J., Finer, J., Clardy, J. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 98, 4664-4665.
- ¹⁹⁹ Tanaka, J., Higa, T. (1984) *Chem. Lett.* 231-232.
- ²⁰⁰ Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L., Santacroce, C., Sica, D., Amico, V., Oriente, G., Piatelli, M., Tringali, C. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 575-576.
- ²⁰¹ Sun, H. H., McEnroe, F. J., Fenical, W. (1983) *J. Org. Chem.* 48, 1903-1906.
- ²⁰² Gibbons, G. F., Goad, L. J., Goodwin, T. W. (1968) *Phytochemistry* 7, 983-988.
- ²⁰³ Danise, B., Minale, L., Riccio, R., Amico, V., Oriente, G., Piatelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L. (1977) *Experientia* 33, 413-415.
- ²⁰⁴ Ravi, B. N., Wells, R. J. (1982) *Aust. J. Chem.* 35, 121-128.
- ²⁰⁵ Ireland, C., Faulkner, D. J. (1977) *J. Org. Chem.* 42, 3157-3162.
- ²⁰⁶ Kirkup, M. P., Moore, R. E. (1983) *Phytochemistry* 22, 2539-2541.
- ²⁰⁷ Vázquez, J. T., Chang, M., Nakanishi, K., Manta, E., Perez, C., Martin, J. D. (1988) *J. Org. Chem.* 53, 4797-4800.
- ²⁰⁸ in: *The Merck Index*, 10 th Edition (1993) No. 4157, Merck & Co. Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A.
- ²⁰⁹ Pietra, F. (1997) *Nat. Prod. Rep.* 14, 543-464.
- ²¹⁰ König, G. M., Wright, A. D. (1996) *Planta Med.* 62, 193-211.
- ²¹¹ a) Baute, M.-A., Deffieux, G., Baute, R., Neveu, A. (1978) *J. Antibiotics* 31, 1099-1101. b) Deffieux, G., Baute, M.-A., Baute, R., Filleau, M.-J. (1978) *J. Antibiotics* 31, 1102-1105. c) Deffieux, G., Filleau, M.-J., Baute, R. (1978) *J. Antibiotics* 31, 1106-1109.
- ²¹² a) Frederick, C. B., Szanislo, P. J., Vickrey, P. E., Bentley, M. D., Shive, W. (1981) *Biochemistry*, 20, 2432-2436. b) Frederick, C. B., Bentley, M. D., Shive, W. (1981) *Biochemistry*, 20, 2436-2438.
- ²¹³ Grabley, S., Hammann, P., Thiericke, R., Wink, J., Philipps, S., Zeeck, A. (1993) *J. Antibiotics*, 46, 343-345.
- ²¹⁴ Rama Rao, A. V., Murthy, V. S., Sharma, G. V. M. (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 143-146.
- ²¹⁵ Overeem, J. C., Van Dijkman, A. (1968) *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 87, 940-944.
- ²¹⁶ Kameda, K., Aoki, H., Namiki, M., Overeem, J. C. (1974) *Tetrahedron Lett.* 1, 103-106.
- ²¹⁷ *MassLib für PC* (Version 8.6), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- ²¹⁸ Krebs, H. Chr. (1986) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 49, 152-363.
- ²¹⁹ Rodriguez, A. D.; Piña, I. C.; Barnes, C. L. (1995) *J. Org. Chem.*, 60, 8096-8100.
- ²²⁰ König, G. M.; Wright, A. D.; Sticher, O.; Angerhofer, C. K.; Pezzuto, J. M. (1994) *Planta Med.* 60, 532-537.
- ²²¹ Coval, S. J.; Patton, R. W.; Petrin, J. M.; James, L.; Rothofsky, M. L.; Lin, S. L.; Patel, M.; Reed, J. K.; McPhail, A. T.; Bishop, W. R. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6, 909-912.

- ²²² Bowden, B. F.; Coll, J. C.; Heaton, A.; König, G.; Bruck, M. A.; Cramer, R. E.; Klein, D. M.; Scheuer, P. J. (1987) *J. Nat. Prod.* 50, 650-659.
- ²²³ Bowden, B. F.; Coll, J. C.; Liyanage, N.; Mitchell, S. J.; Stokie, G. J.; Van Altena, I. A. (1978) *Aust. J. Chem.* 31, 163-170.
- ²²⁴ Kusumi, T.; Yamada, K.; Ishitsuka, M. O.; Fujita, Y.; Kakisawa, H. (1990) *Chem. Letters* 1315-1318.
- ²²⁵ Bowden, B. F.; Coll, J. C.; Hicks, W.; Kazlauskas, R.; Mitchell, S. J. (1978) *Aust. J. Chem.* 31, 2707-2712.
- ²²⁶ Bergquist, P. R. (1980) *New Zealand J. Zool.* 7, 1-6.
- ²²⁷ Van Soest, R. W. M. (1990) in: *New Perspectives in Sponge Biology*, (Rützler, K., Hrsg.), S. 344-350, Smithsonian Institution Press, Washington, U.S.A.
- ²²⁸ Wahlberg, I., Eklund, A.-M. (1992) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 60, 1-141.
- ²²⁹ Kusumi, T., Yamada, K., Ishitsuka, M. O. (1990) *Chem. Lett.*, 1315-1318.
- ²³⁰ König, G. M., Wright, A. D. (1993) in: *Human Medicinal Agents from Plants*, ACS Symposium Series No. 534, (Kingham, A. D., Balandrin, M. F., Hrsg.), S. 277-293, American Chemical Society, Washington, DC, U.S.A.
- ²³¹ Weislow, O. S., Kiser, R., Fine, D. L., Bader, J., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R. (1989) *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 577-586.
- ²³² Schultz, R. J., National Institute of Health, NCI, Bethesda, Maryland, U. S. A., Schmitz, F. J., University of Oklahoma, Norman, U. S. A., unveröffentliche Ergebnisse.
- ²³³ Coll, J. C., Bowden, B. F., König, G. M., Braslau, R., Price, I. R. (1986) *Bull. Soc. Chim. Belg.* 95, 815-834.
- ²³⁴ Coll, J. C., Price, I. R., König, G. M., Bowden, B. F. (1987) *Marine Biology*, 96, 129-135.